

**EXPRESSION VON INTRAZISTERNALEN
A - PARTIKELN IN STRAHLENINDUZIERTEN
OSTEOSARKOMEN DER MAUS**

Disbui. München

1989

ELISABETH SEIDEL





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Molekulare Zellpathologie
des Instituts für Biologie der Gesellschaft für Strahlen-
und Umweltforschung mbH München

Leiter: PD Dr. V. Erfle

vorgelegt über das Institut für
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

EXPRESSION VON INTRAZISTERNALEN A-PARTIKELN IN
STRAHLENINDUZIERTEN OSTEOSARKOMEN DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Elisabeth Seidel
aus
Neuburg an der Donau

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. Dr.habil. H. Petry

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

THEY MET ME IN THE DAY OF SUCCESS;
AND I HAVE LEARNT BY THE PERFECTEST
REPORT, THEY HAVE MORE IN THEM
THAN MORTAL KNOWLEDGE. WHEN I
BURNED IN DESIRE TO QUESTION THEM
FURTHER, THEY MADE THEMSELVES AIR,
INTO WHICH THEY VANISHED.

WILLIAM SHAKESPEARE, MACBETH

INHALTSANGABE

SEITE

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. IAP - Morphologie und Struktur des viralen Genoms	2
2.2. IAP- Vorkommen und Expression	6
2.3. IAP als Insertionsmutagene	9
3. Material und Methoden	12
3.1. Lösungen	12
3.2. Tumormaterial	22
3.3. Kontrollgewebe	22
3.4. Zellen	22
3.5. Zellkultur	23
3.6. Isolierung zellulärer RNS	23
3.7. Isolierung von mRNA aus zellulärer Gesamt-RNS	24
3.8. RNS-Gelelektrophorese, Northern Blot	25
3.9. RNS-Slot Blot	26
3.10. Isolierung zellulärer DNS aus Tumorgewebe	26
3.11. Restriktionsenzymverdau	28
3.12. DNS-Gelelektrophorese, Southern Blot	28
3.13. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	29
3.13.1. Nick Translation	29
3.13.2. Multiprime Reaktion	30
3.14. Hybridisierung von Nitrozellulose- und Biotin-Filmen	31
3.15. Schnellpräparation von Plasmiden	32
3.16. Großpräparation von Plasmiden	33

3.17. Präparation der Hybridisierungsproben	34
3.17.1. Ligierung	35
3.17.2. Transformation	36
3.18. Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	37
3.18.1. Elution von DNS-Fragmenten mit dem Biotrap-Apparat	37
3.18.2. Elution von DNS-Fragmenten mit der DEAE-Membran	38
4. Ergebnisse	39
4.1. Höhe der IAP-Genexpression	39
4.1.1. Typ I IAP-Genexpression	39
4.1.2. Typ II IAP Genexpression	51
4.2. Transkriptlängen der IAP	58
4.2.1. Hybridisierung mit der Typ I IAP Probe	58
4.2.2. Hybridisierung mit der Typ II IAP Probe	63
4.3. Verteilung der Proviren im Genom	63
4.3.1. Verteilung der Typ I IAP-Gene	63
4.3.2. Verteilung der Typ II IAP-Gene	70
5. Diskussion	76
5.1. Höhe der IAP Expression	76
5.2. IAP Transkripte	79
5.3. Verteilung der Proviren in der DNS	81
6. Zusammenfassung - Summary	85
7. Literaturhinweise	87

1. Einleitung und Problemstellung

Endogene Retroviren sind bei einer Reihe von Säugetierspezies als sogenannte "Proviren" im Genom vorhanden und werden von Generation zu Generation vererbt. Diese normalerweise inaktiven Proviren können durch äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlen oder verschiedene Chemikalien aktiviert werden. Solche aktivierten Proviren wurden in physikalisch oder chemisch induzierten Tumoren gefunden. Die ursächliche Beteiligung der endogenen Retroviren an der Entstehung von Tumoren wird daher diskutiert.

Transposons sind ihrer Struktur nach mit den endogenen Retroviren verwandt. Es sind nichtinfektiöse genetische Elemente, die bei niedrigen Tieren, Pflanzen und Hefen vorkommen. Sie können scheinbar ohne äußeren Anlaß an einer beliebigen Stelle im Genom neu integrieren und so als Insertionsmutagen wirken. Durch verschiedene äußere Faktoren wird die Häufigkeit solcher Transpositionen stark erhöht. Bei den Säugetieren existieren vergleichbare Elemente, zum Beispiel die sogenannten intrazisternalen A-Typ Partikel (IAP) der Nager.

In strahleninduzierten Osteosarkomen der Maus wurden sowohl endogene Retroviren als auch intrazisternale A-Partikel gefunden (MARQUART 1974). Die Expression von IAP ist in verschiedenen Tumorzelllinien gegenüber dem Normalgewebe stark erhöht (KUFF et al. 1972, LUEDERS et al. 1977a). Auch in strahleninduzierten Osteosarkomen der Maus waren wesentlich mehr intrazisternale A-Partikel zu finden als im normalen Knochengewebe (MARQUART 1974, MARQUART 1976).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Expression und Verteilung der intrazisternalen A-Partikel in strahleninduzierten Osteosarkomen zu untersuchen. Die Höhe der Expression und die Transkriptlängen der RNS sollten bestimmt werden. Außerdem sollte die Verteilung der IAP Subtypen in der DNS untersucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1. IAP - Morphologie und Struktur des viralen Genoms

Erstmals 1955 von FRIEDLAENDER et al. als Anopheles-A-Virus beschrieben, erhielten sie ihre heutige Bezeichnung von Bernhard, der 1958 verschiedene Maustumoren mit dem Elektronenmikroskop untersuchte und die darin vorkommenden Viruspartikel beschrieb.

Bernhard teilte die vorkommenden Partikel aufgrund ihrer Morphologie in A-, B-, und C-Partikel ein.

A-Partikel kommen ausschließlich in den Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) vor. Sie messen etwa 70-100 nm im Durchmesser und bestehen aus zwei dicht aneinanderliegenden konzentrischen Schalen, die einen elektronendurchlässigen Kern umschließen. Die A-Partikel knospen vom ribosomenfreien Teil des rER in dessen Zisternen, wo sie dann verbleiben. IAP sind nicht infektiös.

B- und C-Partikel dagegen können im Verlauf ihres Vermehrungszyklus die Wirtszelle verlassen und neue Zellen infizieren. Sie haben beide eine Hülle aus drei lose aufeinanderfolgenden Schalen um einen elektronendichten Kern, der bei den B-Partikeln exzentrisch, bei den C-Partikeln jedoch konzentrisch gelegen ist. Sie haben einen Durchmesser von 100-110 nm.



Abbildung 1:

Intrazisternale A-Partikel in einem Osteosarkom einer NMRI-Maus (Vergrößerung 52400 x).

Foto: H. Becke und A.B. Murray

A-, B- und C-Partikel sind sich zwar morphologisch ähnlich (DALTON 1972), bei Vergleichen der Nukleinsäuresequenz konnte aber keine Verwandtschaft zwischen IAP und B- oder C-Typ Viren nachgewiesen werden (COLE et al. 1981, KUFF et al. 1972, LUEDERS et al. 1977a, LUEDERS und KUFF 1979, WONG-



STAAL et al. 1975). CALLAHAN et al. identifizierten 1976 bei der asiatischen Mausspezies *Mus cervicolor* ein infektiöses endogenes Retrovirus, M432, das sich bei weiteren Untersuchungen jedoch als verwandt zu IAP erwies (CALLAHAN et al. 1976, CALLAHAN et al. 1977, CALLAHAN et al. 1981, KUFF et al. 1978, KUFF et al. 1980). Diese Verwandtschaft beruht wahrscheinlich auf der Integration von IAP-Sequenzen in das Genom von M432.

WILSON und KUFF konnten 1972 eine aktive reverse Transkriptase nachweisen, die mit intrazisternalen A-Partikeln assoziiert ist. Das Enzym braucht im Gegensatz zu bekannten viralen RNS-abhängigen DNS-Polymerasen für seine Aktivität einen DNS oder RNS Primer. Auch die optimale Salzkonzentration und das benötigte Kation unterscheiden die reverse Transkriptase der IAP von der anderer muriner Retroviren.

Intrazisternale A-Partikel enthalten wie onkogene RNS Viren 60-70S RNS (YANG und WIVEL 1973) sowie 35S, 32S bzw. 28S RNS in unterschiedlichen Anteilen, abhängig von den Zelllinien, aus denen die IAP gewonnen worden waren (PATERSON et al. 1978, ONO et al. 1980). Zwei dieser RNS Spezies kodieren für das Hauptstrukturprotein p73 der IAP, aus dem die innere Hülle besteht. Daneben kommen noch Proteine mit 30 000, 40 000 und 100 000 Dalton Molekulargewicht vor. Die äußere Schale enthält mehrere Polypeptide, von denen das häufigste eine Molekulargewicht von etwa 80 000 Dalton hat (MARCIANI und KUFF 1973). Möglicherweise enthält die äußere Hülle auch Proteine des endoplasmatischen Retikulums, die während der Abschnürung der Partikel integriert werden. Insgesamt enthalten die IAP 80 % Protein, 14 % Phospholipide und 5-6 % RNS (WIVEL et al. 1973).

Der Aufbau des IAP-Genoms ähnelt dem der Retroviren: ein 5'LTR, das Gen für die Kernproteine, das Gen für die reverse Transkriptase und das 3'LTR. Die LTRs enthalten die Steuereinheiten des IAP Genoms: regulatorische Sequenzen für die Initiation, Promotion, Polyadenylierung und Termination der Transkription (KUFF et al. 1983b). Ein LTR besteht aus einer Region, die für das 3'Ende des RNS Genoms charakteristisch ist (U3), einer redundanten Region (R-Region) und einer für das 5'Ende der viralen RNS charakteristischen Region (U5) (TEMIN 1981, VARMUS 1982).

Lange Zeit wurde angenommen, daß IAP Gene im Grunde dieselbe Struktur haben und von identischen LTRs begrenzt werden (COLE et al. 1981, KUFF et al. 1983a, KUFF et al. 1983b, ONO et al. 1984). Unterschiedliche Restriktionsstellen wurden als Zufallsmutationen interpretiert, die nach der Integration erfolgt waren (ONO und OHISHI 1983, ONO et al 1984, CANAANI et al. 1983, KUFF et al. 1983b). Die LTRs von IAP sind aber von sehr heterogener Struktur und können beträchtlich in Länge und Aufbau variieren (KUFF et al. 1981, COLE et al. 1981, CHRISTY et al. 1985).

Die Länge der LTRs der IAP-Gene hängt ausschließlich von der Länge der R-Region ab. Dabei gibt es zwei Größen: die "langen" LTRs (475 ± 15 bp) und die "kurzen" LTRs (335 ± 15 bp). Die regulatorischen Sequenzen in der U3-Region sind hochkonserviert, das heißt, sie sind bei allen IAP-LTRs in der gleichen Anordnung zu finden (ONO et al. 1980, CHRISTY et al. 1985).

Die Sequenzen zwischen den beiden LTRs kodieren für das *gag*-Gen, das Hauptstrukturprotein der Kernregion, und das *pol*-Gen, die für Retroviren typische reverse Transkriptase (LUEDERS und MIETZ 1986). Die auf die *pol*-Region folgenden Sequenzen sind bei Retroviren normalerweise für die Produktion der Hüllproteine des Viruspartikels zuständig (*env*-Gen). Bei den IAP konnte jedoch an dieser Stelle kein offener Leserahmen gefunden werden (YMER et al. 1986). Diese Tatsache wird dafür verantwortlich gemacht, daß keine Produktion von infektiösen Viruspartikeln erfolgt (KUFF und FEWELL 1985, ONO et al. 1985).

Es gibt zwei Typen von IAP: Typ I IAP stellen etwa 75 % der gesamten IAP-Sequenzen, Typ II IAP nur etwa 10 %. Dabei besitzen die Typ I IAP das Genom in seiner vollen Länge von 7,2 kb, die Typ II IAP dagegen haben ein deletiertes Genom, außerdem sind sie durch eine spezifische Insertion von etwa 500 Basenpaaren gekennzeichnet. Daneben existieren auch noch deletierte Formen von Typ I, denen aber zur Unterscheidung von Typ II IAP die spezifische Insertion fehlt (SHEN-ONG und COLE 1982 und 1984).

Trotz der weitaus kleineren Anzahl von Typ II Genen ist es meist diese Gruppe, die bei Transpositionen beteiligt ist (LUEDERS und MIETZ 1986). Die

Typ II Gene sind häufig mit anderen repetitiven Sequenzen im Mausgenom assoziiert (LUEDERS 1987).

Die IAP haben große strukturelle Ähnlichkeit mit einem weiteren transponierbaren Element, dem Ty 1 Element von *Saccharomyces cerevisiae*. Ty Elemente können ebenfalls in zwei Subtypen unterteilt werden, die anhand von zwei großen Substitutionen unterschieden werden. Sie haben am Ende sogenannte direct terminal repeats (δ -Sequenzen). Von den Ty Elementen sind ebenfalls zahlreiche Beispiele von Transpositionen bekannt, die zu Mutationen am Integrationsort führten (Literatur bei FINNEGAN 1985).

2.2. IAP- Vorkommen und Expression

Intrazisternale A-Partikel werden in Oozyten, im ovulierten Ei und in Embryos vor der Implantation ab dem Zwei-Zellstadium bis zum Blastozysten exprimiert (CALARCO und SZOLLOSI 1973). In diesen frühen Entwicklungsstadien kommen zwei morphologisch unterschiedliche Typen von intrazisternalen A-Partikeln vor, die aber nichts mit den beiden genomischen Subtypen zu tun haben: "große" IAP und "kleine" IAP(ϵ) (CHASE und PIKO 1973), wobei die "großen" IAP morphologisch den in Tumoren vorkommenden IAP ähnlich sind, die kleinen IAP(ϵ) dagegen morphologisch eher den R-Partikeln des Hamsters entsprechen und embryospezifisch sind (YOTSUYANAGI und SZOLLOSI 1981).

Die IAP(ϵ) werden vor allem im Zwei- bis Acht-Zellstadium exprimiert, nehmen aber in der weiteren Entwicklung bis zum Blastozysten kontinuierlich ab, um dann ganz zu verschwinden. Die "großen" IAP kommen dagegen bereits in Oozyten bis zur Ovulation vor, sind im ovulierten Ei und den frühen Teilungsphasen des Embryos selten zu finden, nehmen aber ab dem Acht-Zellstadium bis zum Blastozysten wieder zu (PIKO et al. 1984).

Die Expression der im Genom des Embryos integrierten IAP-Sequenzen steht vermutlich unter autonomer Kontrolle und wird nicht von angrenzenden zellulären Sequenzen reguliert (HOWE und OVERTON 1986). Auch im Normalgewebe adulter Tiere erfolgt die Kontrolle wohl autonom, aber Expression und Translation sind hier zeitlich nicht beschränkt (GROSSMAN et al. 1987).

Die Menge an IAP-spezifischen RNS-Transkripten im embryonalen Gewebe ist abhängig vom Entwicklungsstand und kann beträchtlich variieren. Der Großteil der Transkripte ist 5,4 kb lang. Daneben existiert noch eine Reihe von kleineren Transkripten bis zu 3,5 kb. Diese Variabilität der IAP-RNS ist durch die Transkription von Genen mit unterschiedlich langen Deletionen bedingt und nicht durch verschiedenes Splicing der IAP-RNS (SHEN-ONG und COLE 1982). Die IAP-spezifische RNS ist etwa zu 60 % polyadenyliert und macht 0,25-0,5 % der gesamten Poly(A)⁺ RNS im Embryo aus.

Fast die gesamte IAP-spezifische RNS im Embryo ist nicht partikelgebunden und steht damit für die Proteinsynthese zur Verfügung. Antikörper gegen IAP-Proteine präzipitierten fünf verschiedene Proteine eines Molekulargewichts zwischen 67 und 77 kD in Embryos des Zwei- bis Acht-Zellstadiums (PIKO et al. 1984). Zwei dieser Proteine werden auch im Morula- und Blastozystenstadium noch produziert.

Zu Zeiten hoher Expression der "großen" IAP findet man pro intrazisternalem A-Partikel etwa 30-100 RNS-Moleküle. Das Auftreten der IAP(ϵ) im Embryo dagegen ist offensichtlich nicht mit der Menge an IAP-spezifischer RNS korreliert. Die IAP(ϵ) sind sogar zu der Zeit am häufigsten vertreten, zu der nur eine relativ geringe Menge an IAP-spezifischer RNS gefunden wird: dann stehen $1-2 \times 10^5$ Partikel weniger als 10^4 RNS-Molekülen gegenüber.

Dieser große Unterschied in der Expressionsrate läßt darauf schließen, daß die kleinen IAP sich genetisch von den großen IAP unterscheiden. Vielleicht stellen sie eine eigene Familie Genome dar und die für sie spezifische RNS konnte noch nicht nachgewiesen werden (PIKO et al. 1984). Maus-Embryos exprimieren IAP-verwandte Antigene auf ihrer Zelloberfläche, die sich mit IAP-spezifischem Antiserum nachweisen lassen (HUANG und CALARCO 1981a und b). Mit demselben Antiserum lassen sich auch Zisternen des endoplasmatischen Retikulums markieren, die IAP(ϵ) enthalten (HUANG und CALARCO 1982).

Bei adulten Mäusen wurden intrazisternale A-Partikel elektronenmikroskopisch in einer Reihe verschiedener Tumoren und Tumorzelllinien beobachtet: In durch Methylcholanthren induzierten epidermalen Karzinomen (KAKEFUDA et al. 1970), in Adenomen, Adenokarzinomen, Myoepitheliomen,

Hämangioendotheliomen, Hepatomen, Plasmazytomen (WIVEL und SMITH 1971), in strahleninduzierten Osteosarkomen (MARQUART 1974), in Rhabdomyosarkomen und Neuroblastomen (LUEDERS et al. 1977a), in Ehrlich Aszites Tumorzellen (YASUZUMI und SUGIHARA 1958), in Teratokarzinom-Zelllinien (HOJMAN-MONTES DE OCA et al. 1983), in embryonalen Karzinom-Zelllinien nach Induktion durch Retinsäure (HOWE und OVERTON 1986), sowie in Mausembryo-Fibroblasten nach Induktion durch 5-Azacytidin (HSIAO et al. 1986).

WIVEL und SMITH konnten auch im Normalgewebe der Maus 1971 elektronenmikroskopisch intrazisternale A-Partikel nachweisen. Im normalen trabekulären Knochengewebe einiger Labormausstämme fand MARQUART 1976 IAP. Die Expression von IAP-RNS ist im Normalgewebe am höchsten im Thymus, etwa 5-10 mal höher als beispielsweise in Milz, Leber und Niere. Die im Normalgewebe hauptsächlich auftretenden Transkriptgrößen sind 7,2 und 5,4 kb (KUFF und FEWELL 1985), jedoch herrscht das 5,4 kb lange Transkript deutlich vor (GROSSMAN et al. 1987). Die IAP-Gene, die bei verschiedenen Mausstämmen im Thymus exprimiert wurden, haben eine nahezu identische Sequenz.

In Myelomzellen dagegen treten 3 verschiedene Transkriptlängen auf: 7,2 kb, 5,3 kb und 3,8 kb (MORGAN und HUANG 1984, WUJCIK et al. 1984). Neuroblastome und embryonale Teratokarzinome wiesen allerdings wiederum die gleichen Transkripte wie die Normalgewebe auf, in den Teratokarzinomen war ebenfalls das 5,3 kb lange Transkript das häufigste (PATERSON et al. 1978, HOJMAN-MONTES DE OCA et al. 1983).

Von den zahlreichen IAP-Genen ist nur eine relativ kleine Anzahl transkriptional aktiv. Die Aktivität wird durch den Grad der Methylierung der jeweiligen Gene geregelt (HOJMAN-MONTES DE OCA et al. 1983). Auch bei Untersuchungen von verschiedenen Plasmazytomen stellte sich heraus, daß die Expression von IAP in diesen Tumoren von der Methylierung der DNS-Äquivalente abhängig ist. In NIH/3T3 Fibroblasten, die als Kontrollzellen verwendet wurden, war die Expression dagegen vom Methylierungsgrad unabhängig, was die Autoren auf die allgemein niedrigere Methylierungsrate bei dieser Zelllinie zurückführen (MORGAN und HUANG 1984). Die Hypomethylierung ist also eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für die Genaktivierung. Durch welche Ereignisse

die IAP-Gene aktiviert werden können, ist noch nicht bekannt. Denkbar sind chemische Stoffe oder ionisierende Strahlung, die demethylierend wirken können.

2.3. IAP als Insertionsmutagene

HAWLEY et al. beschrieben zwei Hybridomzelllinien, die nicht mehr in der Lage waren, die κ -Leichtkette eines Immunglobulins zu produzieren. In beiden Fällen fanden die Autoren ein Rearrangement des inaktivierten Gens mit Insertion eines repetitiven DNS-Elements (HAWLEY et al. 1982, 1984).

Die Analyse dieses DNS-Elements ergab, daß es sich dabei um eine IAP-verwandte Sequenz handelte. KUFF et al. bestätigten dieses Ergebnis und konnten durch weitere Analysen zeigen, daß die Integration der IAP durch einen Mechanismus erfolgt war, der dem der Integration bei Retroviren entspricht (KUFF et al. 1983a und b).

LUEDERS et al. berichteten 1982 über ein α -Globin Pseudogen der Maus, das an einer neuen Stelle auf Chromosom 15 integriert und die für die funktionellen Gene charakteristischen Introns verloren hatte. Auch in diesem Fall hatten retrovirusähnliche Sequenzen auf beiden Seiten des mutierten Pseudogens inseriert. Wie genauere Untersuchungen zeigten, handelte es sich dabei wiederum um ein IAP-Gen.

RECHAVI et al. veröffentlichten 1982 eine Arbeit über die Aktivierung des zellulären Onkogens *c-mos* im Myelom XRPC24 einer Maus. Die Autoren konnten in Transfektionsexperimenten mit NIH 3T3 Zellen eine transformierende Aktivität des rearrangierten Gens *rc-mos* nachweisen. Zusätzlich zu dieser biologischen Aktivierung waren im Tumorgewebe auch Transkripte von *rc-mos* nachweisbar. Bis dahin waren noch in keinem Fall *c-mos* Transkripte gefunden worden (GATTONI et al. 1982).

Eine Analyse des rearrangierten Gens *rc-mos* zeigte, daß sich *c-mos* und *rc-mos* in der 5'Region unterschieden, und zwar waren etwa ein Viertel der kodierenden Sequenzen des *c-mos* deletiert. An ihrer Stelle hatte ein fremdes DNS-Element inseriert. Aus der Struktur des fremden Elements schlossen die Autoren, daß es sich wahrscheinlich um eine Art Transposon handelte. 1983 bestätigten KUFF et al. diese

Vermutung und zeigten durch Homologiestudien, daß es sich bei dem fraglichen Element um ein Mitglied der IAP-Genfamilie handelte, das in einer Kopf-an-Kopf (5'an 5') Konfiguration inseriert hatte. Die Transkriptionsrichtung des IAP war also der des *c-mos* entgegengesetzt.

In einem weiteren Myelom, NSI, wurde ein Rearrangement des *c-mos* Gens gefunden (COHEN et al. 1983). Wiederum hatte ein IAP-Element in das betreffende Gen inseriert, diesmal aber in einer Kopf-an-Schwanz (3'an 5') Orientierung. Das rearrangierte Gen fand sich auch in verschiedenen NSI-Hybridomzelllinien (GATTONI-CELLI et al. 1983, CANAANI et al. 1983 und 1984).

Die Transkriptionsaktivität dieser Myelome war wesentlich geringer als beim Myelom XRPC 24. Der Grund liegt vermutlich in der anderen Orientierung sowie der etwas anderen Lokalisation der Insertion. Eine transkriptionelle Aktivität fanden nur GATTONI-CELLI et al. (1983), andere Autoren konnten dagegen keine Transkription von *rc-mos*^{NCI} nachweisen (COHEN et al. 1983, CANAANI et al. 1984).

Ingezüchtete Mausstämme können aufgrund der Produktion von Renin in der Submaxillardrüse in zwei Gruppen eingeteilt werden: Stämme mit hoher Produktion und solche mit geringer Produktion. Die Stämme mit hoher Produktion haben ein zweites Renin-Gen, *Ren-2*, das den wenig produzierenden Stämmen fehlt. Dies ist wohl für die hohe Expressions- und Translationsrate bei den Stämmen mit beiden Genen verantwortlich.

Beim Vergleich von *Ren-1* mit *Ren-2* fand sich eine Insertion von 3 kb in der 3' flankierenden Region von *Ren-2* (BURT et al. 1984). Die genaue Analyse des inserierten Elements ergab, daß es sich um ein IAP-Genom handelte.

Wenn man die gesicherte Korrelation zwischen proviralen LTRs und geänderter Expression benachbarter Gene erwägt, so erscheint es sehr wahrscheinlich, daß die hohe Expression von *Ren-2* durch die Insertion des IAP-Genoms zustande kommt.

Die myelomonozytäre Leukämiezelllinie WEHI-3B produziert unabhängig von einer vorangegangenen Stimulation konstitutiv IL-3. Andere Lymphokine lassen sich in der Zelllinie nicht nachweisen. Das Interleukin-3-Gen ist am 5'Ende nahe der Promotorregion rearrangiert (YMER et al. 1985). Hier war ein etwa 4,8 kb großes retrovirusähnliches Element inseriert. Sequenzvergleiche ergaben, daß das inserierte

Element 93 % Homologie mit einem IAP-Genom hatte. Das IAP hatte in 5'an 5'Richtung inseriert und trotz der anderen Transkriptionsrichtung die Expression des IL-3 Gens erhöht.

Eine Erklärung für die Aktivierung von Genen durch den Promotor eines in 5'-5'Orientierung inserierten genetischen Elements wäre ein Promotor, der bidirektional funktioniert. Tatsächlich gibt es einen IAP-Klon, für den die Existenz eines solchen bidirektionalen Promotors nachgewiesen werden konnte (CHRISTY und HUANG 1988). Die Analyse der U3-Region verschiedener IAP-LTRs ergab, daß hier alle regulatorischen Elemente vorhanden sind, die für eine bidirektionale Transkription nötig sind.

IAP-LTRs können auch in heterologe Zellen durch Transfektion eingeführt werden und sind dort als Promotoren aktiv (LUEDERS et al. 1984).

Da die IAP selbst nur in Tumorzellen transkriptional aktiv sind, wurde getestet, ob die IAP in Gegenwart von Onkogen-Produkten aktiv transkribiert werden. Die Transkriptionsaktivität stieg in Anwesenheit von p53, des large T-Antigens des SV 40, des Adenovirus E1A Genprodukts und des *myc* Genprodukts. Die Transkription von IAP kann also durch Onkogenprodukte gesteigert werden (LURIA und HOROWITZ 1986).

Von einer Ratten-Maus-Hybridomzelllinie wurden cDNS Klone isoliert, die für Faktoren kodieren, die die Produktion von Immunglobulin E (IgE) regulieren, sogenannte IgE Bindungsfaktoren (IgE-BF), MARTENS et al. 1985). Diese Faktoren können die Produktion von IgE stimulieren (IgE potentiating factor, IgE-PF) oder hemmen (IgE suppressing factor, IgE-SF). Trotz der gegenteiligen Wirkung von IgE-BF und IgE-SF werden beide Faktoren von demselben Gen kodiert. Die entgegengesetzte Wirkung beruht auf einer unterschiedlichen Glykosylierung der gemeinsamen Polypeptidkette (MARTENS et al. 1987).

Einer dieser Klone zeigte bei genauerer Untersuchung eine enge Verwandtschaft zu bekannten IAP-Klonen und wurde durch verschiedene Vergleiche als Mitglied der IAP-Genfamilie identifiziert (MOORE et al. 1986). Bestätigt wurde dieser Befund durch Untersuchung weiterer Klone: alle stellten Strukturvarianten der IAP-Gene dar (KUFF et al. 1986).

3. Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden falls nicht anders vermerkt- von einer der folgenden Firmen bezogen: Merck, Sigma, Boehringer Mannheim, Serva, Bethesda Research Laboratories (BRL).

3.1. Lösungen

Amp-Platten

Agar	1,5 %
In LB-Medium lösen, autoklavieren	
Ampicillin	30 mg/l
Nach dem Autoklavieren zugeben	

BPB Bromphenolblau-Ladepuffer I

Glycerin	80,0 %
BPB	0,1 %

BPB-Ladepuffer III

Harnstoff	4 M
Sucrose	50 %
Ethylendiamintetraessigsäure	
EDTA, pH 8,0	50 mM
BPB	0,25 %

Brij-DOC-Lösung

Brij 58	10 %ig
Na-Desoxycholat	10 %ig

Lösungen getrennt herstellen und autoklavieren; im Verhältnis Brij/DOC 2:1 mischen

Cäsiumchloridlösung

CsCl (Baker)	5,7 M
Na-Acetat, pH 5,0	25 mM

Chloroform/Isoamylalkohol (CIA)

Im Verhältnis 24:1 mischen

Dehybridisierungspuffer für Biotin Membran

Na-Phosphat pH 7,0	10 mM
Formamid	50 %

Dehybridisierungspuffer für Nitrozellulose

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
SDS	0,5 %
EDTA	2 mM
Na-Pyrophosphat	0,5 mM
Vor Gebrauch 1:15 verdünnen	

100 x Denhardt's Lösung

Ficoll	2 %
Polyvinylpyrrolidon	2 %
Bovines Serumalbumin	2 %

DEPC-H₂O (Diethylpyrocarbonat)

DEPC	0,1 %
------	-------

Im Abzug in Millipore-H₂O pipettieren, kräftig schütteln, über Nacht stehen lassen, autoklavieren

Elutionspuffer für Oligo(dT)-Zellulose Säule

SDS	0,05 %
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

Ethidumbromid-Tüpfelplatten

Agarose in H ₂ O	1 %
EtBr	0,5 µg/ml

Agarose im Mikrowellenherd schmelzen, Ethidumbromid nach Abkühlen auf unter 60°C zugeben

Glyoxilierungsmix

Na-Phosphat pH 7,0	10 mM
Glyoxal	1 M
DMSO	50 %

Homogenisierungslösung DNS

Tris-HCl	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	10 mM
SDS	0,1 %
Proteinase K	100 µg/ml

Hybridisierungslösung DNS, stringent

Formamid	50 %
SSC	5 x
Denhardt's	5 x
Na-Phosphat, pH 6,5	20 mM
Lachssperma (denaturiert)	0,05 mg/ml
Dextransulfat	2,5 %

Hybridisierungslösung DNS, nicht stringent

Formamid	40 %
SSC	6 x
Denhardt's	5 x
Na-Phosphat, pH 6,5	20 mM
Lachssperma DNS (denaturiert)	0,05 mg/ml
Dextransulfat	2,5 %

Hybridisierungslösung RNS

Formamid	50 %
SSC	5 x
Denhardt's	5 x
Na-Phosphat, pH 7,0	50 mM
Lachssperma DNS (denaturiert)	0,25 mg/ml
SDS	0,1 %

Ladepuffer für Oligo(dT)-Zellulose Säule

LiCL	0,4 M
SDS	0,1 %
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

LB-Medium

Trypton	1 %
NaCl	0,5 %
Hefeextrakt	0,5 %

10 x Ligasepuffer

Tris-HCl	660 mM
MgCl ₂	50 mM
Dithiothreitol	50 mM
(DTT)	
ATP	10 mM

Lysispuffer

Guanidinium-Isothiocyanat	4 M
Na-Citrat, pH 7,0	25 mM
β-Mercaptoethanol	0,1 M

Guanidinium-Isothiocyanat einwiegen, mit Millipore-H₂O und Na-Citrat auffüllen und vollständig lösen, im Abzug β-Mercaptoethanol zugeben

Natrium-Phosphat

NaH ₂ PO ₄	0,5 M
Na ₂ HPO ₄	0,5 M

Die beiden Lösungen mischen bis zum pH-Wert 7,0

NET-Puffer

NaCl	150 mM
EDTA	0,1 mM
Tris-HCl	20 mM

NET-Hochsalz-Puffer

NaCl	1 M
EDTA	0,1 mM
Tris-HCl	20 mM

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, pH Wert 7,2)

NaCl	0,82 %
KCl	0,04 %
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0,17 %
KH ₂ PO ₄	0,03 %

PEG (Polyethylenglykol) in NaCl

NaCl	1,5 M
PEG 6000	30 %

700 ml 1,5 M NaCl autoklavieren, in die noch warme Lösung 300 g Polyethylenglykol 6000 einrühren

Phenol, Tris-gesättigt

Phenol (Riedel-de Haen) im Container bei 68°C schmelzen, im Verhältnis 1:1 ausschütteln mit:

-Aqua dest.

-Tris-HCl, pH 8,0 1 M

-Tris-HCl, pH 8,0 0,1 M

Mit 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 überschichten

Proteinase K-Puffer

SDS	0,5 %
in 1 x TE-Puffer	

20 x SSC pH 7,5

NaCl	3 M
Tri-Na-Zitrat	0,3 M
pH-Wert mit Essigsäure einstellen	

50 x TE pH 7,5

Tris-Base	0,5 M
EDTA	50 mM
pH-Wert mit 37 %iger Salzsäure einstellen	

10 x TGA pH 8,1

Tris-Base	0,4 M
Na-Azetat	0,2 M
EDTA	0,2 M

1 x TNE

Tris-HCl	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM

Tris-Saccharose Lösung

Tris-HCl	50 mM
Saccharose	25 %
EDTA	1 mM

0,05 % Trypsinlösung

Trypsin	0,05 %
EDTA in PBS	0,02 %

Vorhybridisierungslösung DNS, stringent

Formamid	50 %
SSC	5 x
Denhardt's	5 x
Na-Phosphat, pH 6,5	50 mM
Lachssperma DNS (denaturiert)	0,25 mg/ml
Glycin	1 %

Vorhybridisierungslösung DNS, nicht stringent

Formamid	40 %
SSC	6 x
Denhardt's	5 x
Na-Phosphat, pH 6,5	50 mM
Lachssperma DNS (denaturiert)	0,25 mg/ml
Glycin	1 %

Vorhybridisierungslösung RNS

Formamid	50 %
SSC	5 x
Denhardt's	5 x
Na-Phosphat, pH 6,5	50 mM
Lachssperma DNS (denaturiert)	0,25 mg/ml
SDS	0,1 %

Waschlösung I DNS

SSC	2 x
Denhardt's	0,5 x

Waschlösung II DNS

SSC	2 x
SDS	0,1 %

Waschlösung III DNS, stringent

SSC	0,1 x
SDS	0,1 %

Waschlösung III DNS, nicht stringent

SSC	1 x
SDS	0,1 %

Waschlösung I RNS

SSC	2 x
SDS	0,1 %

Waschlösung II RNS

SSC	0,1 x
SDS	0,1 %

3.2. Tumormaterial

Für die Untersuchungen wurden Primärtransplantate von Osteosarkomen verwendet, die durch Inkorporation von kurzlebigen osteotropen Radionukliden induziert worden waren. Als Versuchstiere wurden vorwiegend weibliche Mäuse der Laborstämme BALB/c, NMRI und CBA verwendet. Bei den Radionukliden handelte es sich um die kurzlebigen Alpha-Strahler Radium 224 und Thorium 227, den ebenfalls kurzlebigen Beta-Strahler Lutetium 177 sowie den Beta-strahler Actinium 227, das Mutternuklid von Thorium 227. Die Radionuklide wurden den Mäusen ab der 4. Lebenswoche i.p. injiziert. Die entstandenen Tumoren wurden einmal transplantiert, die Transplantattumoren nach Tötung der Tiere entnommen, histologisch charakterisiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C aufbewahrt.

3.3. Kontrollgewebe

Als Kontrolle diente Knochenmaterial von gesunden Mäusen. Dafür wurden die Kalvarien von je 12 neugeborenen und je 4 ausgewachsenen Mäusen jedes Stammes nach Tötung entnommen, kurz in PBS (3.1.) gewaschen, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Als zusätzliche Kontrolle wurden den Tieren noch Leber, Milz, Thymus und Gehirn entnommen. Die Behandlung und Lagerung erfolgte wie oben beschrieben. Zur Unterscheidung der beiden Proben wurde das vom Neugeborenen stammende Gewebe jeweils mit "I", das Gewebe des erwachsenen Tieres mit "II" gekennzeichnet.

3.4. Zellen

Die embryonale Karzinomzelllinie F9 diente sowohl als Positiv- als auch als Negativkontrolle. Diese Zelllinie zeigt im undifferenzierten Zustand keine erkennbare Expression von IAP und differenziert spontan nur sehr selten. Die Differenzierung ist aber durch Behandlung mit Retinolsäure induzierbar (HOWE und OVERTON 1986 und dort zitierte Literatur). Diese differenzierten F9 Zellen aber exprimieren in hohem Maße IAP.

3.5. Zellkultur

Die Anzucht der Zellen erfolgte bei 37°C mit 5 %iger CO₂-Spannung und in gesättigter Wasserdampfatmosfera. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (D'MEM) der Firma Gibco mit 2,2 g/l Bicarbonat unter Zusatz von 10 % hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS, Flow) verwendet. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium aus den Kulturgefäßen abgossen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit einer Trypsinlösung (3.1.) vom Kulturgefäß abgelöst. Die Neueinsaat der Zellen erfolgte in einer 1:20 Verdünnung.

Die Induzierung der Zellen zur Differenzierung erfolgte durch Zugabe von Retinolsäure in einer Konzentration von 5×10^{-7} M. Da Retinolsäure nicht wasserlöslich ist, wurden zunächst 3,04 mg Retinolsäure (Sigma) pro ml Lösungsmittel in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Diese Lösung wurde zunächst 1:100 mit absolutem Alkohol verdünnt und schließlich durch eine 1:200 Verdünnung in Medium auf die gewünschte Endkonzentration gebracht.

Die Behandlung der Zellen erfolgte erst 1-2 Tage nach der Einsaat, da sich frühere Zugabe sehr negativ auf das weitere Wachstum der F9 Zellen auswirkte. Nach einer Behandlungszeit von 72 Stunden wurden die Zellen direkt zur RNS-Isolierung verwendet.

3.6. Isolierung zellulärer RNS

Die Isolierung zellulärer RNS erfolgte in Anlehnung an die Methode von CHIRGWIN et al. (1979).

Zum Zellaufschluß wurde ein Gewebestück von etwa 0,2 bis 0,5 g Gewicht mit Hilfe eines Dismembrators (Fa. Braun) unter Zugabe von 0,5 ml Lysispuffer (3.1.) und etwa 2 ml flüssigem Stickstoff in einer Teflonkapsel mit Stahlkugel etwa 40-45 Sek. pulverisiert. Das zermahlene Gewebe wurde mit weiteren 2,5 ml Lysispuffer verrührt und bis zur völligen Lösung bei Raumtemperatur auf einem Vortex-Mixer gemischt. Um große DNS-Moleküle zu scherem und die Viskosität zu erniedrigen, wurde die Lösung 15-20 Sek. mit Ultraschall behandelt.

Zur Entfernung der Gewebsüberreste wurde die Lösung 10 Min. bei 18°C mit 10 000 Upm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert (RC-5C-Zentrifuge, Fa. Sorvall). Der Überstand wurde sofort in ein steriles Plastikröhrchen dekantiert und das Pellet verworfen. Das Lysat wurde nun auf ein 2 ml Kissen einer 5,7 M Cäsiumchloridlösung (3.1.) pipettiert und mindestens 18 Stunden in einer Ultrazentrifuge (L5-50, Fa. Beckmann, Rotor SW 50-1, Becher 34.9) bei 18°C mit 40 000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet einmal mit DEPC-Wasser (3.1.) gewaschen und in 300 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden Verdünnungen der RNS-Suspension sowie Standardlösungen bekannter RNS-Konzentration auf eine Ethidiumbromidplatte (3.1.) aufgetüpfelt, diese unter UV-Licht photographiert (Polaroid-Film Nr. 665, Kodak-Rotfilter Nr.23A) und die Fluoreszenz mit dem Standard verglichen.

Die RNS-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3M Natrium-Azetat und dem 2,5fachen Volumen absoluten Ethanol versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

Bei der RNS-Isolierung aus Zellkulturen erfolgte der Zellaufschluß noch im Kulturgefäß nach einmaligem Waschen mit PBS, das wieder abgenommen wurde, durch Zugabe von bis zu 3 ml Lysispuffer. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei der Isolierung aus Tumorgewebe.

3.7. Isolierung von mRNS aus zellulärer Gesamt-RNS

Die Isolierung von polyadenylierter mRNS erfolgte nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie über eine Oligo(dT)-Zellulose-Säule (AVIV und LEDER 1972; EDMONDS et al. 1971). Hierbei wird die mRNS bei hoher Salzkonzentration spezifisch an die Säule gebunden und mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration wieder eluiert. Dabei werden 100 mg Oligo(dT)-Zellulose für etwa 1 mg Gesamt-RNS eingesetzt.

Die benötigte Menge an Oligo(dT)-Zellulose wurde in ein Eppendorfgefäß eingewogen, in 1 ml Elutionspuffer (3.1.) gelöst und in eine silikonisierte Pasteurpipette aus Glas eingefüllt, deren Öffnung mit einer silikonisierten Glaskugel verengt worden war. Zur Äquilibration wurde die Säule mit dem 10fachen Volumen Ladepuffer (3.1.) gewaschen. Die in 200-300 µl DEPC-Wasser gelöste RNS wurde in einem Wasserbad 5 Min. auf 68°C erhitzt, nach Abkühlung in Eis mit

dem gleichen Volumen 2fach konzentrierten Ladepuffers versetzt und auf die Säule aufgetragen. Der Durchlauf wurde aufgefangen, nochmals erhitzt und nach dem Abkühlen wiederum auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde nun mit dem 5fachen Volumen Ladepuffer und anschließend mit dem 5fachen Volumen Waschpuffer (3.1.) gewaschen. Die an die Oligo(dT)-Zellulose gebundene Boten-RNS konnte nun mit Elutionspuffer von der Säule gelöst und aufgefangen werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie bei der Gesamt-RNS auf einer Ethidiumbromid-Tüpfelplatte im Vergleich mit RNS-Lösungen bekannter Konzentration.

Die Ausbeute bei dieser Methode lag bei 1-2 % der eingesetzten Gesamt-RNS.

3.8. RNS-Gelelektrophorese, Northern Blot

Für die Gelelektrophorese wurden 10 µg Gesamt-RNS (bzw. 1 µg mRNS) aus der Alkoholfällung entnommen, 30 Min. mit 10 000 Upm bei 4°C zentrifugiert, mit 70 %igem Alkohol gewaschen und nochmals 20 Min. unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das RNS-Pellet wurde 5 Min. im Lyophilisator getrocknet, zur Denaturierung in 8 µl Glyoxilierungsmix (McMASTER und CARMICHAEL, 1977; 3.1.) resuspendiert und 60 Min. bei 50°C inkubiert.

Nach dem Abkühlen wurde die Probe mit je 2 µl BPB-Ladepuffer (3.1.) versetzt und die Probe sofort auf ein 1-1,2 %iges Agarosegel (Seakem-Agarose in 10 mM Na-Phosphatpuffer) aufgetragen. Für Gesamt-RNS wurden sogenannte "Minigele" (11 x 14 cm) verwendet, mRNS-Proben wurden auf "Babygele" (7,5 x 5 cm) aufgetragen. Auf den beiden äußersten Bahnen wurde zur Größenbestimmung Längenstandard II (LS II, Boehringer Mannheim), der in gleicher Weise wie die Probe denaturiert worden war, aufgetragen. Dieser Standard hat acht Fragmente von je 23,9 kb, 9,5 kb, 6,6 kb, 4,4 kb, 2,3 kb, 2,0 kb, 0,5 kb und 0,1 kb.

Die Auftrennung erfolgte bei 70 Volt 3-4 Stunden oder bei 20-30 Volt über Nacht (mRNS: 20-30 Volt 24 Stunden) unter Verwendung einer 10 mM Natriumphosphatlösung als Laufpuffer. Um den pH-Wert konstant zu halten, mußte der Puffer die ganze Laufzeit hindurch mit einer Pumpe von der Kathode zur Anode umgewälzt werden.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung konnte ohne weitere Vorbehandlung des Gels die Übertragung der RNS-Fragmente auf Biotin-Membranen (Pall Ultrafine Filtration Corporation) erfolgen.

Gebottet wurde über Nacht (McMASTER und CARMICHAEL 1977) unter Verwendung von 20 x SSC (3.1.) und 3MM Chromatographie-Papier (Whatman). Nach 30 Min. Trocknungszeit bei Raumtemperatur wurde das Filter 1-2 Stunden zur Fixierung der RNS-Moleküle bei 80°C im Heißluftofen "gebacken" und zum Schutz vor Feuchtigkeit in Plastik eingeschweißt.

Nach erfolgtem Blotten wurde das Gel mit einer Acridinorangelösung (1:200 mit Aqua dest. verdünnt) 20-30 Min. angefärbt und nach Entfärben mit 10 mM Na-Phosphat die Vollständigkeit des RNS-Transfers unter UV-Licht kontrolliert.

3.9. RNS-Slot Blot

Es wurden 3 µg RNS aus der Alkoholfällung entnommen und wie unter 3.8. beschrieben abzentrifugiert.

Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl DEPC-H₂O aufgenommen, mit 6 µl 20 x SSC und 4 µl 37 %igem Formalin versetzt und zur Denaturierung 15 Min. bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurde die so behandelte RNS-Probe direkt unter Vakuum durch die Schlitze eines Minifold-II-Apparates auf eine Biotin-Membran aufgetragen (MANIATIS et al. 1982). Das (nicht zu starke) Vakuum wurde durch Anschluß des Gerätes an eine Wasserstrahlpumpe erzeugt.

Das Filter wurde bei Raumtemperatur 30 Min. getrocknet, 1-2 Stunden im 80°C Heißluftofen gebacken und in eine Plastikhülle eingeschweißt.

3.10. Isolierung zellulärer DNS aus Tumorgewebe

Die Isolierung zellulärer DNS erfolgte in Anlehnung an MANIATIS et al., 1982.

Der Zellaufschluß erfolgte wie bei der RNS-Isolierung durch Homogenisierung im Braun Dismembrator. Es wurden etwa 0,3-0,5 g Tumorgewebe mit 2 ml flüssigem Stickstoff in einer vorgekühlten Teflonkapsel mit Stahlkugel 40-45 Sek. pulverisiert. Das Pulver wurde in ein 50 ml Polypropylen-

Schwarzkappenröhrchen gefüllt und mit 8 ml Homogenisierungslösung bis zur völligen Lösung vorsichtig verrührt. Das Lysat wurde 1-2 Stunden im Wasserbad bei 50°C und anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um die Proteine durch die Proteinase K abzubauen.

Falls die Lösung am nächsten Tag sehr viskös war, wurde etwas TNE-Puffer (3.1.) zur Verdünnung zugegeben.

Die Entfernung der abgebauten Proteine erfolgte durch 3-4maliges Ausschütteln mit dem gleichen Volumen einer 1:1 Mischung aus Tris-gesättigtem Phenol und CIA (3.1.).

Nach gründlicher Durchmischung der DNS-Lösung mit diesen Lösungen (Testtube Rotator, 5 Min., 20 Upm) wurde jeweils 5 Min. mit 10 000 Upm im Ausschwingrotor (HB-4) bei Raumtemperatur zentrifugiert (RC-5C-Zentrifuge, Sorvall). Anschließend wurde die die DNS enthaltende wässrige Phase mit großlumigen Glaspipetten vorsichtig abpipettiert. Zur Entfernung von Phenolresten wurde anschließend 3-4mal mit dem gleichen Volumen CIA extrahiert. Um wiederum Chloroformreste zu entfernen, wurde 1-2mal mit wassergesättigtem Diethylether ausgeschüttelt. Dabei war zu beachten, daß die DNS-Lösung diesmal unten lag und die Etherphase abgehoben werden mußte. Eventuell verbleibende Etherreste wurden mit Stickstoff ausgeblasen.

Um das Volumen einzuengen und zur Reinigung erfolgte als nächster Schritt eine Alkoholfällung. Dafür wurden zu der DNS-Lösung 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat und 2,5 Volumen absolutes Ethanol gegeben. Das sofort ausfallende glasige Präzipitat wurde mit einem Glasstab "gefischt", in 70 %igem Alkohol gewaschen und in 1-2 ml 1x TE-Puffer (3.1.) aufgenommen und 10 Min. bis 2 Stunden im Wasserbad bei 50°C gelöst; eventuell war eine Inkubation über Nacht im 37°C Brutschrank notwendig.

War die DNS vollständig gelöst, wurde durch Zugabe von 100 µg/ml Pankreas-RNase A (Sigma) und Inkubation bei 37°C für 30-60 Min. die Degradierung der RNS erreicht. Im Anschluß daran wurde die RNase A ihrerseits durch Zugabe von 100 µg/ml Proteinase K und Inkubation für 30-60 Min. bei 37°C degradiert. Zur Entfernung der Proteinase K und der Ribonukleotide war eine zweimalige Behandlung mit Phenol/CIA, CIA und Ether notwendig.

Nach der zweiten Ethanolfällung wurde die DNS in 2-3 ml 1 x TE aufgenommen und gelöst.

Die Dialyse der DNS erfolgte in Ultrahülsen (Schleicher & Schuell, UH 100/25) gegen 1 l 1 x TE/ml DNS bei 4°C über Nacht. Durch Druckdialyse in einem Ultrahülsengerät (Schleicher & Schuell, UH 100/1), das an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen wurde, wurde das Volumen auf 0,5-1 ml eingengt.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Auftüpfeln auf Ethidiumbromid-Tüpfelplatten und Vergleich der Fluoreszenz mit Standardlösungen aus Lachssperma-DNS.

Die DNS-Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

3.11. Restriktionsenzymverdau

Die DNS wurde mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Hind III (Boehringer Mannheim, Biolabs) in definierte Fragmente geschnitten (MANIATIS et al. 1982). Diese beiden Restriktionsenzyme waren gewählt worden, weil sie konservierte Restriktionsstellen in den IAP-Genen erkennen (SHEN-ONG und COLE 1982). Um einen vollständigen Verdau der DNS zu erreichen, wurden 5-8 Einheiten Enzym pro µg DNS eingesetzt. Als Reaktionspuffer für die Restriktionsenzyme dienen NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration. Da Eco RI und Hind III unterschiedliche Salzkonzentrationen für ihre optimale Reaktivität benötigen, wurden die Verdau nacheinander vorgenommen und bei Zugabe von Eco RI die NaCl-Konzentration von 50 mM auf 100 mM erhöht.

Der Verdau erfolgte bei 37°C über mehrere Stunden, eventuell auch über Nacht. Die Vollständigkeit des Verdau wurde durch Auftrag eines Aliquots aus der Probe auf ein "Babygel" und elektrophoretische Auftrennung überprüft. War der Verdau vollständig, wurde die Reaktion durch 5 Min. Erhitzen auf 65°C abgestoppt. Nach kurzer Abkühlung im Eisbad wurde die Probe mit 0,1 Volumen BPB-Ladepuffer versetzt und die präparative Elektrophorese durchgeführt.

3.12. DNS-Gelelektrophorese, Southern Blot

Die Auftrennung der DNS erfolgte entweder auf Minigelen (100 ml 1 %iger Seakem-Agarose in 1 x TGA; 3.1.) oder auf 20 x 25 cm großen Gelen (400 ml

1 %iger Agarose in 1 x TGA). Um die DNS sichtbar zu machen, wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in das Gel oder in den Laufpuffer gegeben.

Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurden auf den beiden äußeren Bahnen Längenstandard II aufgetragen (Boehringer Mannheim). Nach der Elektrophorese wurde das Gel im durchscheinenden UV-Licht unter Verwendung eines Rotfilters mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert.

Die Übertragung der DNS auf Nitrozellulose-Filter (Schleicher & Schuell) erfolgte in Anlehnung an die Southern-Methode (SOUTHERN 1975). Hierbei wurde das Gel zunächst 10-15 Min. in 0,25 M HCl gelegt, um durch Strangbrüche die Übertragung von großen DNS-Fragmenten zu erleichtern. Danach wurde 45 Min.-1 Stunde denaturiert (0,2 M NaOH, 0,6 M NaCl) und anschließend bis zu einem pH-Wert von 7,5-8 neutralisiert (1 M Tris-HCl, 0,6 M NaCl). Geblottet wurde wiederum über Nacht unter Verwendung von 20 x SSC und 3MM Whatman Papier. Das Filter wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend zur Fixierung der DNS 2 Stunden im 80°C Heißluftofen gebacken. Zum Schutz vor Feuchtigkeit wurde das Filter in eine Plastiktüte eingeschweißt.

Die Vollständigkeit des Transfers konnte durch Kontrolle des ethidiumbromidgefärbten Gels unter UV-Licht überprüft werden.

3.13. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Für die Hybridisierung wurden die DNS-Proben mit (α - ^{32}P) dCTP (Amersham Buchler Braunschweig, spez. Aktivität 111 TBq/mmol = 3000 Ci/mmol) radioaktiv markiert. Für die Markierung wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: die sogenannte Nick-Translation oder die Multiprime Reaktion.

3.13.1. Nick Translation

Die Nick Translation wurde mit einem Reaktions-Kit der Firma Amersham durchgeführt. Für den Ansatz wurden DNS, (α - ^{32}P)dCTP, nicht markierte Nukleotide (dATP, dGTP, dTTP) in 5fach konzentriertem Nick-Translationspuffer, DNS-Polymerase I und DNase I nach Firmenvorschrift gemischt und eine Stunde bei 14°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,2 Volumen 0,5 M EDTA abgestoppt. Die Isolierung der radioaktiv markierten Fragmente erfolgte über eine

Chromatographiesäule aus Biogel P 60 (Biorad) in 1 x TE. Der gesamte Nick-Translationsansatz wurde in 200-300 µg 1 x TE aufgenommen und auf die Säule aufgetragen und mit 1 x TE gespült. Der Durchlauf wurde in 8 Fraktionen zu je 0,5 ml aufgefangen.

Pro Fraktion wurden 5 µl-Aliquots entnommen und nach CERENKOV (MANIATIS et al. 1982) in Szintillationsröhrchen gemessen (^3H -Kanal). Der 1. Peak, der die markierte DNS enthielt, wurde gepoolt und daraus ein 5 µl- Aliquot in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Aquasol-2 New England Nuclear, ^{32}P -Kanal) gemessen. Über diesen Wert konnte die spezifische Aktivität der Probe in cpm/ml errechnet werden.

Vor dem Einsatz in der Hybridisierung mußte die Probe noch durch 10 Min. Erhitzen auf 95°C denaturiert werden.

3.13.2. Multiprime Reaktion

Für die Multiprime Reaktion wurde ein Kit der Firma Amersham verwendet. Die DNS-Probe wurde bereits vor dem Versuchsansatz durch 10 Min. Erhitzen auf 95°C denaturiert. Das Volumen wurde mit Millipore- H_2O auf 11,5 µl gebracht und der Versuchsansatz aus der denaturierten DNS, ($\alpha\text{-}^{32}\text{P}$)dCTP, nicht markierten Nukleotiden in Pufferlösung, einem Zufallprimer und einer DNS-Polymerase (Klenow-Fragment) nach Firmenvorschrift gemischt. Der Reaktionsansatz wurde mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Messung des Einbaus wurden je 2 µl einer 1:20 Verdünnung des Multiprime Ansatzes auf insgesamt vier DE 81 Filter (Whatman) aufgetragen. Je zwei der Filter wurden mehreren Waschschritten unterzogen, durch die unspezifisch gebundene Radioaktivität abgewaschen wurde. Dabei wurden die Filter zunächst 15 Min. in einer 0,5 M Dinatriumphosphatlösung geschwenkt, wobei der Puffer dreimal erneuert wurde. Die Filter wurden dann 5 Min. in Millipore- H_2O geschwenkt und abschließend kurz in absolutem Alkohol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden alle vier Filter in Szintillationsröhrchen überführt, 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 501, Zinsser Analytic) zugegeben und im ^{32}P -Kanal gemessen. Aus der Differenz der Werte für die gewaschenen gegenüber den ungewaschenen Filtern konnte der Einbau markierter Nukleotide berechnet werden. Unter Berücksichtigung

der Verdünnung sowie des Gesamtvolumens des Ansatzes konnte dann die Ausbeute in cpm/ml bestimmt werden.

3.14. Hybridisierung von Nitrozellulose- und Biotin-Filtern

Bei der Hybridisierung bilden die fixierten einzelsträngigen DNS- und RNS-Moleküle mit der radioaktiv markierten Probe entsprechend ihrer Homologie ein doppelsträngiges Hybridmolekül. Zur Vorbereitung wurden die Filter mit den DNS- oder RNS-Fragmenten in der Vorhybridisierungslösung (3.1.) mindestens 3 Stunden bei 42°C inkubiert. Die radioaktiv markierte Probe wurde nach Denaturierung (10 Min. 95°C) zu der vorbereiteten Hybridisierungslösung pipettiert; dabei wurden 12×10^6 cpm/ml eingesetzt. Die Filter wurden mit der Hybridisierungslösung mindestens 20 Stunden bei derselben Temperatur inkubiert, bei der auch die Vorhybridisierung erfolgt war.

Nach Entfernung der Hybridisierungsflüssigkeit wurden unspezifisch gebundene Fragmente durch mehrere Waschschriffe entfernt.

Die Nitrozellulosefilter (DNS) wurden zunächst 30 Min. bei Raumtemperatur im Waschpuffer I in einer Wanne unter leichtem Schütteln inkubiert. Darauf folgten 15 Min. Schütteln bei Raumtemperatur im Waschpuffer II, wobei die Lösung jeweils nach 5 Min. gewechselt wurde. Abschließend wurde das Filter in Waschpuffer III in einem Schüttelwasserbad bei 65°C 1 Stunde inkubiert. Die Salzkonzentration wurde je nach der erwarteten Homologie höher oder niedriger (stringent oder weniger stringent) gewählt. Die Abnahme der spezifischen Aktivität wurde mit einem Kontaminationsdetektor (Berthold) überprüft.

Nach dem Waschen wurden die Nitrozellulosefilter an der Luft getrocknet, in dünne Plastikbeutel eingeschweißt und zwischen zwei Röntgenfilme in Agfa-Röntgenfilmkassetten mit 2 Du-Pont Verstärkerfolien gelegt. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C über 1-10 Tage.

Die Biotin-Membranen (RNS) wurden zunächst im Waschpuffer I 15 Min. leicht geschüttelt, wobei der Puffer jeweils nach 5 Min. erneuert wurde. Danach wurden die Membranen im Waschpuffer II bei 60°C etwa 1 Stunde im Schüttelwasserbad inkubiert. Auch hierbei wurde die Abnahme der spezifischen Aktivität laufend überprüft.

Die Biotransfer-Filter wurden nach dem Waschen sofort feucht eingeschweißt, um ein irreversibles Binden der Hybridisierungsprobe zu vermeiden. Die Autoradiographie erfolgte wie oben beschrieben. Um eine subjektive Deutung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Filme mit Hilfe eines Laser-Densitometers (LKB) gemessen und die integrierte Fläche der aufgezeichneten Kurve als Berechnungsgrundlage verwendet. Falls ein zu starkes Hintergrundsignal die Auswertung mit dem Densitometer unmöglich machte, wurden die Autoradiogramme mit dem bloßen Auge ausgewertet.

Um Ungenauigkeiten durch verschiedenen große Auftragsmengen an RNS auszugleichen, wurden die Membranen jeweils mit einer Aktin-Probe hybridisiert, die Exponate mit dem Densitometer gemessen und mit Hilfe dieses Wertes der Wert für die IAP-Expression entsprechend der RNS-Menge berechnet.

Nach Ende der Autoradiographie wurden die Filter dehybridisiert. Bei Nitrozellulose erfolgte dies durch mehrstündiges Waschen in Dehybridisierungspuffer für Nitrozellulose (3.1.) bei 65°C unter leichtem Schütteln.

Biotransfer Membranen wurden 1 Stunde bei 60°C in Dehybridisierungspuffer für Biotransfer Membranen (3.1.) unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden sie noch 15 Min. bei Raumtemperatur in Waschlösung I (3.1.) geschwenkt.

Die erfolgreiche Dehybridisierung wurde bei beiden Filtern durch Autoradiographie kontrolliert.

3.15. Schnellpräparation von Plasmiden

Die Schnellpräparation von Plasmiden erfolgte in Anlehnung an MANIATIS et al., 1982.

Der Typ I-spezifische Klon pMIA 10-1 lag als Plasmid-DNS in Alkohol vor und mußte zunächst noch transformiert werden (3.17.2.). Der Typ II-spezifische Klon lag in einer Stichtkultur vor und konnte direkt auf Amp-Platten (3.1.) ausgestrichen werden. Danach wurde je eine Einzelkolonie von den Platten gepickt, jeweils eine 5 ml Übernachtskultur angesetzt (5 ml LB-Medium (3.1.) mit 50 µg/ml Ampicillin) und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde von dieser Übernachtskultur je 1 ml entnommen und zu 1 ml Glycerin gegeben. Diese Glycerinkultur diente als Vorrat für Großpräparationen.

Der Rest der Kultur wurde 10 Min. mit 3000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,7 ml Zippy-Puffer (3.1.) aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 50 µl Lysozym (10 mg/ml, Sigma) wurde die Lösung in ein Eppendorfgefäß bei offenem Deckel 30-40 Sek. gekocht. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 10 000 Upm wurde der Bakteriendebris mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Aus der DNS-Lösung wurden die Proteine durch eine Behandlung mit Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol entfernt und die DNS 2 Stunden bei -20°C in Alkohol gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wurde die DNS im Lyophilisator getrocknet, in 50 µl 1 x TE gelöst und ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dafür wurden jeweils 10 µl DNS-Lösung mit 1-3 U Enzym und 20 µg/ml RNase A behandelt.

Die Schnellanalyse der verdauten DNS erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung auf einem Babygel bei 60-80 Volt für 30-60 Min.

3.16. Großpräparation von Plasmiden

Die präparative Isolierung von Plasmiden erfolgte nach der Methode von HARDIES et al. (1979).

0,5-1 l Übernachtskultur in LB-Medium wurden 20 Min. mit 8000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml Tris-Saccharose-Lösung (3.1.) resuspendiert und in ein 65 ml Polycarbonat-Röhrchen für den Beckman FW 35-Rotor überführt. Nach Zugabe von 3 ml 0,5 M EDTA und 3 ml Lysozymlösung (30 mg/ml) wurde die Suspension gut gemischt und zum Zellaufschluß 45 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden 2,5 ml Brij-DOC-Lösung zugegeben und die Suspension sofort durch mehrfaches Invertieren des Röhrchens vermischt. Nach einer Inkubation von 10 Min. auf Eis zur Zelllyse wurden die in der Zwischenzeit bereits austarierten Röhrchen in den vorgekühlten FW-35 Rotor überführt und in 60 Min. bei 4°C mit 28 000 Upm die Zelltrümmer abzentrifugiert.

Der klare Überstand wurde in einen Zentrifugenbecher für den HB-4 Rotor dekantiert, mit 100 µg RNase A pro ml Plasmidlösung versetzt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung zur Fällung der Plasmid-DNS mit dem halben Volumen eisgekühltem PEG 6000 in 1,5 M NaCl (3.1.) 30 Min. auf Eis inkubiert und anschließend 20 Min. bei 4°C mit 8000 Upm zentrifugiert. Das Pellet

wurde in 5 ml Proteinase K-Puffer gelöst, 50 µg Proteinase K pro ml Plasmidlösung zugegeben und 1 Stunde bei 37°C in einem 10 ml Plastikröhrchen inkubiert.

Die abgebauten Proteine wurden durch zweimalige Extraktion mit dem gleichen Volumen TE-gesättigtem Phenol und zweimalige Extraktion mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus gleichen Teilen Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol. Überschüssiges Phenol wurde durch zweimalige Extraktion mit dem gleichen Volumen CIA entfernt. Chloroformreste konnten durch eine weitere Extraktion mit dem gleichen Volumen wassergesättigtem Diethylether entfernt werden. Nach jedem Extraktionsschritt wurde zur Trennung der Phasen 5 Min. bei Raumtemperatur mit 10 000 Upm zentrifugiert.

Die nach Abheben des Ethers verbleibende wässrige Phase wurde mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat und 2,5 Volumen Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Die gefällte DNS wurde 20 Min. bei 4°C mit 13 000 Upm zentrifugiert, mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und nochmals 10 Min. zentrifugiert. Nach Abgießen des 70 %igen Alkohols wurde das Pellet im Lyophilisator unter Vakuum getrocknet, in 100-300 µl 1 x TE aufgenommen und die Konzentration über eine Tüpfelplatte bestimmt.

3.17. Präparation der Hybridisierungsproben

Als Hybridisierungsproben wurden IAP-Sequenzen verwendet, die spezifisch für Subtyp I oder Subtyp II sind. Sie wurden aus Plasmiden isoliert, die mir freundlicherweise von Dr. Lueders und Dr. Kuff von den National Institutes of Health in Bethesda, Maryland zur Verfügung gestellt worden waren (Abbildung 2).

Zur Erkennung von Typ I-spezifischen Sequenzen wurde zunächst ein 5,2 kb großes Fragment aus dem Insert des Plasmids pMIA 10-1 isoliert. Durch Verdau des Plasmids mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Hind III und nachfolgende Auftrennung der Fragmente durch Gelelektrophorese konnte dieses Fragment gut identifiziert werden. Die Elution aus dem Gel erfolgte wie unter 3.18. beschrieben.

Um jedoch eine Probe größerer Spezifität zu erhalten, erwies es sich als notwendig, ein kleineres, in diesen 5,2 kb enthaltenes Fragment von 1,3 kb zu isolieren. Da von dem größeren Fragment nur geringe Mengen zur Verfügung standen, mußte das 1,3 kb Fragment subkloniert werden.

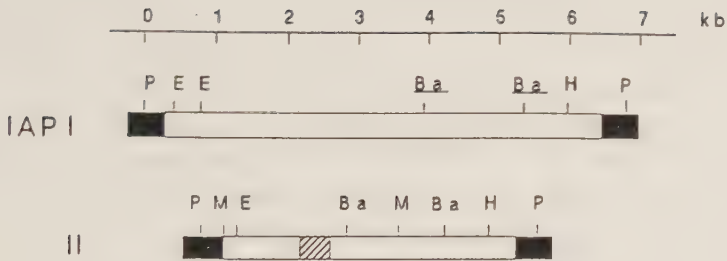


Abbildung 2:

Skizze der IAP-Sequenzen, aus denen die Hybridisierungsproben isoliert wurden. Die fett gedruckten Restriktionsenzyme E und H bei IAP I markieren das zunächst verwendete 5,2 kb Fragment. Das durch Unterstreichung gekennzeichnete Restriktionsenzym Ba markiert das 1,2 kb Fragment. Das schraffierte Kästchen markiert die IAP II Insertion.

Restriktionsenzyme: E, Eco RI; H, Hind III; Ba, Bam HI; M, Msp I; P, Pst I.

3.17.1. Ligierung

Zunächst wurde das isolierte 1,3 kb Fragment, das durch einen Verdau des größeren Fragmentes mit dem Enzym Bam HI gewonnen werden konnte, in einem geeigneten Vektor subkloniert.

Als Vektor wurde das Plasmid pUC 9 (2,7 kb) verwendet. Etwa 1 µg des Plasmids wurden mit 8 U Bam HI verdaut.

Die Vollständigkeit des Verdaus wurde bei beiden Ansätzen mit einem Babygel überprüft, auf das ein Aliquot von je 2 µl aufgetragen wurde. Die Reaktion wurde mit jeweils 1 µl 0,2 M EDTA abgestoppt, die Ansätze 5 Min. auf 65°C erhitzt und danach in Eis gestellt. Die verdaute DNS wurde mit 36 µl 3 M Ammonium-Azetat (zu einer Endkonzentration von 2 M) und mit dem gleichen Volumen Isopropanol (also 55 µl) versetzt und nach mehrfachem Invertieren bei Raumtemperatur 10 Min. inkubiert. Die gefällte DNS wurde 30. Min. bei 4°C mit 13 000 Upm sedimentiert, der Überstand vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und das Pellet zweimal mit 100 µl 70 %igem Alkohol gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde 10 Min. bei 4°C mit 13 000 Upm zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde 2 Min. im Lyophilisator getrocknet, in je 10 µl Millipore-H₂O resuspendiert und die Konzentration auf einer Tüpfelplatte bestimmt.

Da der Ligierungsansatz je 1 Mol der beiden Liganden enthalten sollte, wurden 600 ng des IAP-Inserts und 300 ng der Vektor-DNS eingesetzt. Zu dieser Mischung wurden 2 µl 10 x Ligasepuffer und 2 µl T4 DNS-Ligase (Boehringer Mannheim) pipettiert und der Ansatz bei 12°C im Wasserbad über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde mit einem 2 µl Aliquot auf einem Babygel der Erfolg der Ligierung überprüft. War die Reaktion gut abgelaufen, konnte das Konstrukt transformiert werden.

3.17.2. Transformation

Nach der erfolgten Ligierung wurde der Vektor, der das gewünschte Insert enthielt, in geeignete (durch Einwirkung von Calciumchlorid "kompetent" gemachte, MANDEL und HIGA 1970) Zellen gebracht; die Zellen wurden "transformiert" (MORRISON 1979).

100-200 ng Plasmid-DNS aus dem Ligierungsansatz wurden mit 1 x TE-Puffer auf ein Volumen von 50 µl gebracht. 100 µl einer Zellsuspension aus JM 83 E. coli- Zellen wurden zu dem ligierten Plasmid gegeben und die Mischung zunächst 20 Min. auf Eis und dann 5 Min. bei 37° inkubiert. Nach der Zugabe von 3 ml LB-Medium wurde der Ansatz 30 Min. bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde 10 Min. mit 3000 Upm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in der zurückgelaufenen Flüssigkeit resuspendiert.

Um nun einen das Konstrukt tragenden Einzelklon zu erhalten, wurden 10, 20, 30, 40 und 50 µl der Bakteriensuspension auf fünf X-Gal-Platten (3.1.) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Da bei den das Insert tragenden Bakterien die Fähigkeit verlorengegangen ist, β -Galaktosidase zu bilden, kann man die plasmidtragenden Bakterien an der Bildung weißer Kolonien erkennen. Durch die β -Galaktosidase wird nämlich aus dem farblosen X-Gal durch Hydrolyse das tiefblaue 5-Brom-4-chlor-indigo.

Von jedem Ausstrich wurde am nächsten Tag eine weiße Einzelkolonie gepickt und neu ausplattiert. Dies wurde so lange wiederholt, bis praktisch nur noch weiße Kolonien übrig waren.

Von diesen weißen Einzelkolonien wurde dann jeweils eine 5 ml Übernachtskultur angesetzt und eine Plasmidschnellpräparation durchgeführt. Auf einem Babygel konnte dann geprüft werden, ob diese Klone auch das gewünschte Insert enthielten. Von jedem positiven Klon wurde dann auch eine Glycerinkultur (3.15.) angesetzt.

3.18. Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNS-Fragmenten erfolgte durch Elektro-Elution. Es wurden zwei verschiedene Methoden angewandt:

Der Biotrap-Apparat (Schleicher & Schuell) und die DEAE-Membran (Schleicher & Schuell).

3.18.1. Elution von DNS-Fragmenten mit dem Biotrap-Apparat

Das zu isolierende DNS-Fragment wurde unter Durchleuchtung mit UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten und das Gelstück in die Kammer der Biotrap-Apparatur gelegt. Das Gerät wurde in eine mit 1 x TGA gefüllte Elektrophoresewanne gelegt. An beiden äußeren Seiten des Biotrap-Apparates wurde eine Zellulose-Membran BT 1 eingesetzt. Diese Membran läßt Pufferionen fast widerstandslos passieren, wogegen Makromoleküle quantitativ zurückgehalten werden. Die Zellulose-Membran BT 2, die zwischen Elutionskammer und DNS-Falle eingespannt wurde, diente als Vorfilter und verhinderte das Nachströmen des Puffers und damit ein Überlaufen der Kammer. Die Elution erfolgte über 1-3

Stunden mit einer Spannung von 200 Volt. Zum Schluß wurden die eluierten DNS-Moleküle durch kurzzeitiges Umpolen (20-30 Sek.) bei gleicher Spannung von der BT 1 Membran entfernt. Die DNS-Lösung konnte nun mit einer Pasteurpipette aus der Falle entnommen werden.

3.18.2. Elution von DNS-Fragmenten mit der DEAE-Membran

Ein Streifen der DEAE-Membran wurde entsprechend der Breite der zu isolierenden DNS-Bande zurechtgeschnitten. Kurz vor der gewünschten Bande wurde unter Durchleuchtung mit UV-Licht ein keilförmiges Stück aus der Agarose herausgeschnitten, die Membran eingesetzt und der Agarosekeil zurückgelegt. Falls eine weitere DNS-Bande sehr dicht auf die gewünschte Bande folgte, wurde ein weiterer Streifen direkt hinter der wichtigen Bande plziert, um ein Auflaufen der größeren DNS auf den ersten Membranstreifen zu verhindern.

Die Elektrophorese wurde mit erhöhter Spannung weitergeführt (5 Min. 120 V) bis die Bindung vollständig war, was wegen der Fluoreszenz des Ethidiumbromids unter UV-Licht nachkontrolliert werden konnte. Der Membranstreifen mit der darauf gebundenen DNS wurde zur Reinigung von Agaroseresten 5 Min. in NET-Puffer (3.1.) geschwenkt. Die Ablösung der gebundenen DNS erfolgte mit NET-Hochsalz-Puffer (3.1.). Der Membranstreifen wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 250-300 µl Hochsalzpuffer benetzt. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 65°C unter gelegentlichem Schütteln. Der Puffer wurde abgezogen und die Membran nochmals mit etwa 50 µl Hochsalzpuffer gespült.

Das noch verbleibende Ethidiumbromid wurde durch dreimalige Extraktion mit wassergesättigtem Butanol entfernt. Die Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat und 2,5 Volumen 99 %igem Alkohol versetzt und über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wurde die gefällte DNS 10 Min. bei 4°C mit 10 000 Upm zentrifugiert, das Pellet mit 70 %igem Alkohol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Sediment wurde 5 Min. im Lyophilisator getrocknet, in 50 µl 1 x TE resuspendiert und die Konzentration mit einer Tüpfelplatte bestimmt. Die DNS wurde bei 4°C gelagert.

4. Ergebnisse

4.1. Höhe der IAP-Genexpression

Die Höhe der IAP-Genexpression wurde für die beiden Subtypen Typ I und Typ II IAP mit der Slot Blot Analyse untersucht.

4.1.1. Typ I IAP-Genexpression

Die RNS-Expression der Typ I IAP wurde in strahleninduzierten Osteosarkomen und verschiedenen Normalgeweben von drei Mausstämmen untersucht.

Als Vergleich wurde RNS aus Knochengewebe (Kalvarien), Thymus, Gehirn, Milz und Leber von 1-2 Tage, 2-4 Wochen sowie 10-12 Monate alten Mäusen verwendet.

Als weitere Kontrolle wurde RNS aus F9 Zellen (3.4.) mit einbezogen und zwar von unbehandelten und von zur Differenzierung induzierten Zellen, da F9 Zellen normalerweise keine IAP RNS, nach Induktion mit Retinolsäure aber große Mengen an IAP RNS exprimieren. Die IAP-Expression der induzierten Zellen überstieg die der unbehandelten Zellen deutlich (Abbildung 3).

Es wurden insgesamt 23 Tumoren von den drei Mausstämmen Balb/c, NMRI und CBA untersucht.

Balb/c: Sieben Tumoren stammten von Balb/c Mäusen: OTS 94, OTS 93, OTS 91, OTS 78, OTS 69, OTS 66 und OTS 60.

In der Leber der Balb/s Maus war die Typ I IAP-Expression etwa gleich hoch wie im normalen Knochengewebe. In der Milz war die Expression um etwa das 1,5fache und in Thymus und Gehirn um etwa das 2fache höher als im Knochen (Abbildung 3, Tabelle 1).

Die beiden Densitometer-Meßwerte für die Expression im Knochen betrugen bei den Balb/c Kontrollen 1,45 bzw. 1,42 bei Hybridisierung mit der Typ I spezifischen Probe und 0,55 bzw. 0,50 bei der Aktinhybridisierung (Tabelle 1). Daraus ergab sich ein Wert von 2,6 bzw 2,8 für die Expression von IAP im normalen

Knochen. Für die Berechnung der Expressionserhöhung wurde der Mittelwert dieser beiden Faktoren verwendet (Abbildungen 3 und 4, Tabelle 1).

Die Typ I IAP Expression in OTS 94 und OTS 60 war etwa gleich hoch wie im Knochen. OTS 78 hatte eine etwas geringere Expression und OTS 91, OTS 69 und OTS 66 hatten eine um das 2-3fache höhere Typ I IAP Expression als im normalen Knochen gefunden wurde. Die IAP Expression in OTS 93 war um fast das 9fache gegenüber dem normalen Knochen erhöht.

NMRI: Neun der untersuchten Tumoren stammten von NMRI Mäusen: OTS 50, OTS 37, OTS 36, OTS 34, OTS 27, OTS 19, OTS 12, OTS 11 und OTS 9.

Auch hier diente Knochen-, Thymus-, Gehirn-, Milz- und Leber-RNS als Kontrolle. Der Wert für die Knochen-RNS der ausgewachsenen Maus wich extrem von allen anderen Vergleichswerten ab und wurde daher sehr vorsichtig bewertet. Die Expression in der Leber entsprach der im normalen Knochen. Die Milz hatte eine annähernd doppelt so hohe IAP-Expression wie der normale Knochen. Die Expression in Thymus und Gehirn war mehr als doppelt so hoch wie im normalen Knochen (Abbildungen 5 und 6, Tabelle 2).

Der Tumor OTS 12 hatte eine halb so hohe Typ I IAP Expression wie der Knochen. OTS 34, OTS 19 und OTS 11 hatten eine ähnlich hohe Expression von Typ I IAP wie der normalen Knochen. Keines dieser Osteosarkome hatte mehr als die 1,5fache RNS Expression. OTS 50, OTS 37, OTS 36, OTS 27 und OTS 9 hatten eine um mindestens das 2fache höhere Expression als der normale Knochen.

CBA: Weitere sieben Tumoren stammten vom Mausstamm CBA: OTS 122, OTS 116, OTS 109, OTS 106, OTS 105, OTS 89/II und OTS 58.

Wieder wurden Knochen-, Thymus-, Gehirn-, Milz- und Leber-RNS als Kontrolle verwendet. Die Expression in der Leber erreichte etwa die Hälfte der Expression im Knochen. Die anderen drei Vergleichsgewebe zeigten eine ähnlich hohe Expression wie der normale Knochen (Abbildungen 7 und 8, Tabelle 3).

Nur bei OTS 122 und OTS 109 war die Typ I IAP Expression etwa gleich hoch wie im Knochen. Alle anderen Osteosarkome exprimierten weniger IAP Typ I RNS als der normale Knochen.

Das Verhältnis der IAP Typ I Expression bei den einzelnen Normalgeweben ist bei der Balb/c Maus und bei der NMRI Maus ungefähr gleich. Bei der CBA Maus dagegen wird im Knochen ebenso viel Typ I IAP RNS exprimiert wie in Thymus und Gehirn. Am wenigsten Typ I IAP RNS wird bei der Balb/c Maus exprimiert. Bei der NMRI Maus ist im Normalgewebe die Typ I IAP Expression ungefähr doppelt so hoch und bei der CBA Maus fast 4mal so hoch wie bei der Balb/c Maus.

Diese stammspezifischen Unterschiede waren bei der Untersuchung der Expression von Typ I IAP in den Osteosarkomen nicht festzustellen. In den Osteosarkomen von Balb/c und NMRI Mäusen war die durchschnittliche Expression von Typ I IAP etwa gleich hoch. Bei den Tumoren der CBA Mäuse wurde im Durchschnitt weniger Typ I IAP RNS exprimiert als bei den beiden anderen Stämmen.

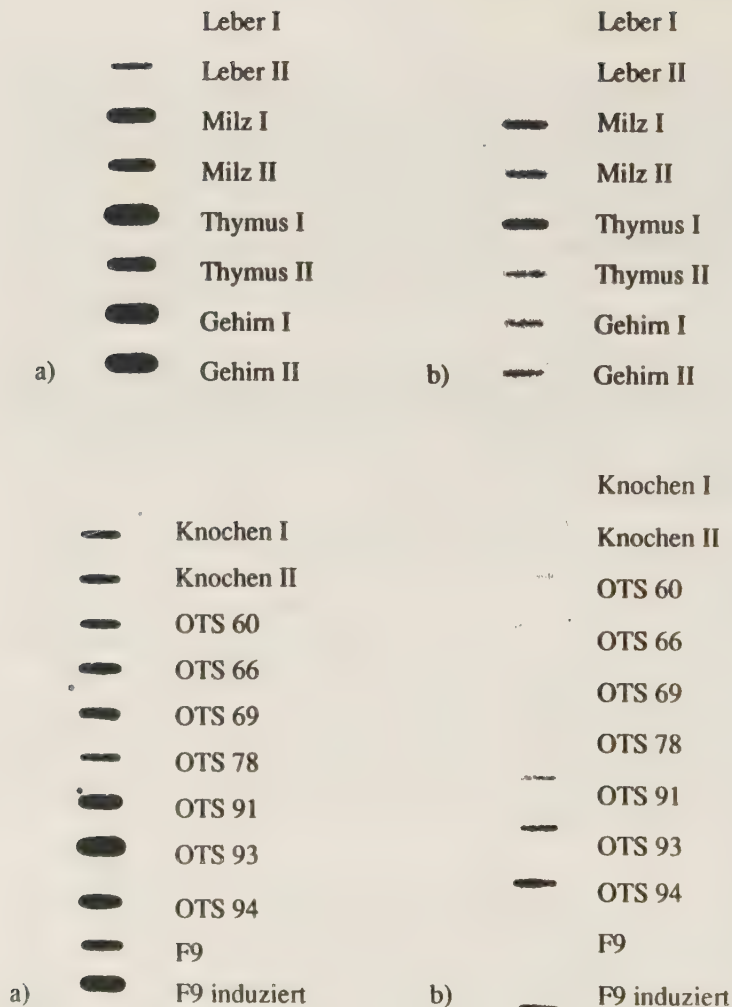


Abbildung 3:

Slot Blot mit RNS von Leber, Milz, Thymus und Gehirn (oben) und mit RNS von Knochen und Osteosarkomen von Balb/c Mäusen (unten). Hybridisierung mit a) Typ I IAP und b) Aktin.

<u>Gewebe</u>	<u>Aktin</u>	<u>IAP</u>	<u>Expression</u>
Knochen I	0,55	1,45	<u>2,60</u>
Knochen II	0,50	1,42	<u>2,80</u>
OTS 94	1,33	4,71	<u>3,54</u>
OTS 93	0,31	7,57	<u>24,42</u>
OTS 91	0,81	5,03	<u>6,21</u>
OTS 78	0,58	1,24	<u>2,14</u>
OTS 69	0,47	2,64	<u>5,62</u>
OTS 66	0,29	2,57	<u>8,86</u>
OTS 60	0,53	1,63	<u>3,10</u>

Leber	~ 1
Milz	~ 1,5
Thymus	~ 2
Gehirn	~ 2

Tabelle 1:

Slot Blot mit RNS von Osteosarkomen und normalem Knochen der Balb/c Maus. Im oberen Teil sind die Ergebnisse der Messung mit dem Laser-Densitometer aufgeführt. Die unterschiedliche Menge an filtergebundener RNS wurde durch die Messung der Aktin-hybridisierung festgestellt. Die Werte der IAP Expression wurden

anhand der Aktinhybridisierung korrigiert. (IAP Messung : Aktin Messung).

Im unteren Teil sind die Schätzwerte für die anderen Normalgewebe im Vergleich zum Knochen dargestellt.

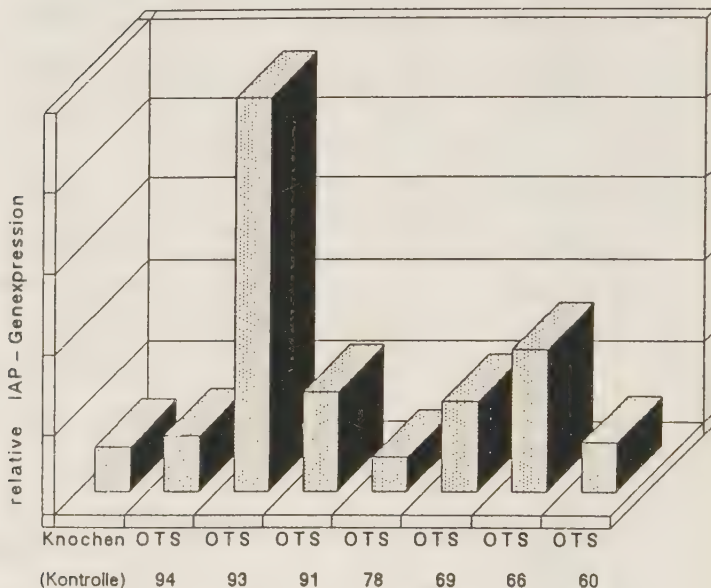


Abbildung 4:

Graphische Darstellung der Typ I IAP Expression in Osteosarkomen der Balb/c Maus im Vergleich zu normalem Knochengewebe.

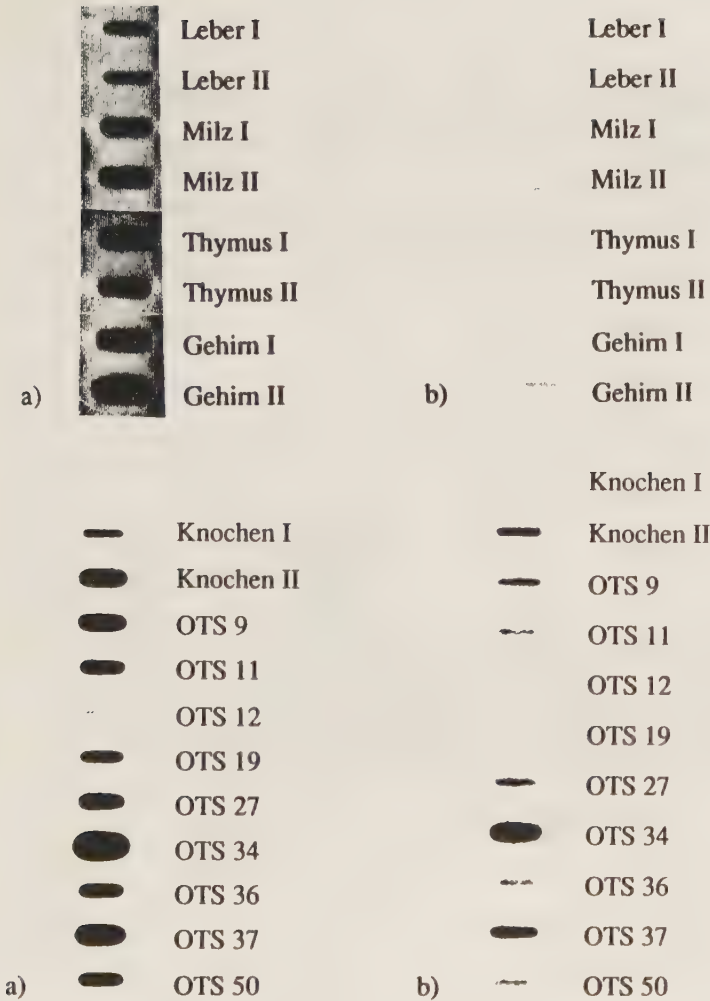


Abbildung 5:

Slot Blot mit RNS von Thymus, Leber, Milz und Gehirn (oben) und mit RNS von Knochen und Osteosarkomen von NMRI Mäusen (unten). Hybridisierung mit a) Typ I IAP und b) Aktin.

<u>Gewebe</u>	<u>Aktin</u>	<u>IAP</u>	<u>Expression</u>
Knochen	0,27	1,28	<u>4,74</u>
OTS 50	0,46	4,41	<u>9,59</u>
OTS 37	0,46	8,41	<u>18,28</u>
OTS 36	0,50	4,48	<u>8,96</u>
OTS 34	1,11	6,46	<u>5,82</u>
OTS 27	0,67	6,40	<u>9,55</u>
OTS 19	0,71	5,52	<u>7,77</u>
OTS 12	0,17	0,38	<u>2,24</u>
OTS 11	0,59	4,27	<u>7,24</u>
OTS 9	0,44	4,19	<u>9,52</u>

Leber	~ 1
Milz	~ 2
Thymus	> 2
Gehirn	> 2

Tabelle 2:

Slot Blot mit RNS von Osteosarkomen und normalem Knochen der NMRI Maus. Im oberen Teil sind die Ergebnisse der Messung mit dem Laser-Densitometer aufgeführt. Die unterschiedliche Menge an filtergebundener RNS wurde durch die Messung der

Aktinhybridisierung festgestellt. Die Werte der IAP Expression wurden anhand der Aktinhybridisierung korrigiert (IAP Messung : Aktin Messung).

Im unteren Teil sind die Schätzwerte für die anderen Normalgewebe im Vergleich zum Knochen dargestellt.



Abbildung 6:

Graphische Darstellung der Typ I IAP Expression in Osteosarkomen der NMRI Maus im Vergleich zu normalem Knochengewebe.

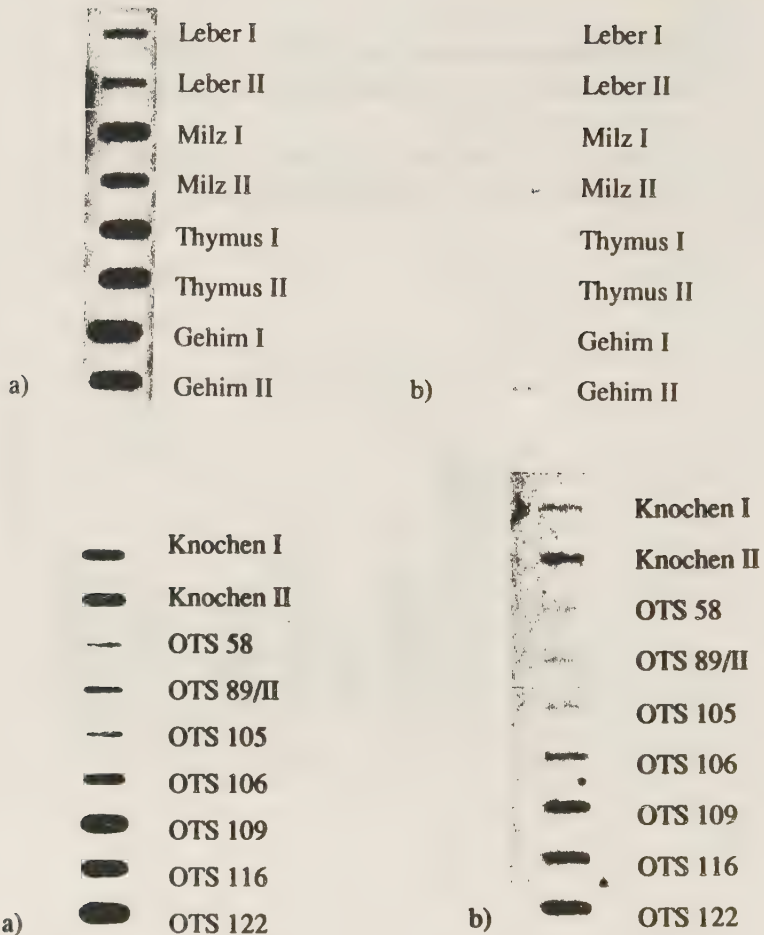


Abbildung 7:

Slot Blot mit RNS von Thymus, Leber, Milz und Gehirn (oben) und mit RNS von Knochen und Osteosarkomen von CBA Mäusen (unten). Hybridisierung mit a) Typ I IAP und b) Aktin.

<u>Gewebe</u>	<u>Aktin</u>	<u>IAP</u>	<u>Expression</u>
Knochen	0,27	2,2	<u>8,14</u>
OTS 122	0,74	7,20	<u>9,73</u>
OTS 116	0,64	5,09	<u>7,95</u>
OTS 109	0,61	6,10	<u>10,00</u>
OTS 106	0,37	2,15	<u>5,81</u>
OTS 105	0,30	0,64	<u>2,13</u>
OTS 89/II	0,22	0,71	<u>3,23</u>
OTS 58	0,28	0,5	<u>1,79</u>

Leber	~ ½
Milz	~ 1
Thymus	~ 1
Gehirn	~ 1

Tabelle 3:

Slot Blot mit RNS von Osteosarkomen und normalem Knochen der CBA Maus. Im oberen Teil sind die Ergebnisse der Messung mit dem Laser-Densitometer aufgeführt. Die unterschiedliche Menge an filtergebundener RNS wurde durch die Messung der Aktinhybridisierung festgestellt. Die Werte der IAP Expression

wurden anhand der Aktinhybridisierung korrigiert (IAP Messung : Aktin Messung).

Im unteren Teil sind die Schätzwerte für die anderen Normalgewebe im Vergleich zum Knochen dargestellt.

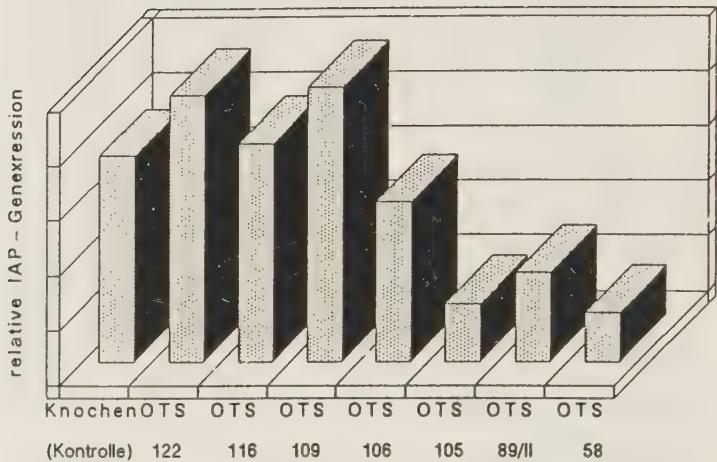


Abbildung 8:

Graphische Darstellung der Typ I IAP Expression in Osteosarkomen der CBA Maus im Vergleich zu normalem Knochen.

4.1.2. Typ II IAP Genexpression

Durch Hybridisierung mit der für Typ II IAP spezifischen Probe wurde untersucht, ob dieser IAP Subtyp in den Osteosarkomen erhöht exprimiert wurde.

Es wurden dieselben 23 Tumoren untersucht wie mit der Typ I IAP Probe. Als Vergleich diente diesmal ausschließlich RNS aus normalem Knochengewebe, da der Knochen das entscheidende Vergleichsgewebe für Osteosarkome ist.

Balb/c: Die densitometrischen Werte für die Expression in den beiden Knochenproben betrugen 0,54 und 0,44. Die Typ II IAP Expression in den Tumoren war in OTS 91, OTS 78, OTS 69 und OTS 60 geringfügig höher als im normalen Knochen. Im OTS 66 war etwas mehr als doppelt so viel Typ II IAP RNS, im OTS 93 fast 3mal so viel exprimiert wie im normalen Knochen (Abbildung 9, Tabelle 4).

NMRI: Der Mittelwert aus den Expressionswerten für die beiden Knochengewebsproben betrug 1,14. Anhand dieses Wertes wurde die Expression in den untersuchten NMRI Tumoren im Vergleich zum normalen Knochen bestimmt.

OTS 37 und OTS 34 haben eine mehr als doppelt so hohe Expression wie der normale Knochen. OTS 50, OTS 36, OTS 27 und OTS 9 liegen in der Expression etwa ebenso hoch wie der Knochen. OTS 19, OTS 12 und OTS 11 exprimieren weniger Typ II IAP als der Knochen (Abbildung 10 und Tabelle 5).

CBA: Für die Knochenproben wurden densitometrisch die Werte 0,87 und 1,52 bestimmt und mit dem Mittelwert daraus die IAP Expression in den Tumoren verglichen. Bei den Tumoren OTS 122, OTS 116 und OTS 109 war die Typ II IAP Expression ungefähr so hoch wie im normalen Knochen. Die anderen Tumoren blieben alle in der Expression zum Teil erheblich unter dem Wert des Knochens. (Abbildung 11 und Tabelle 6).

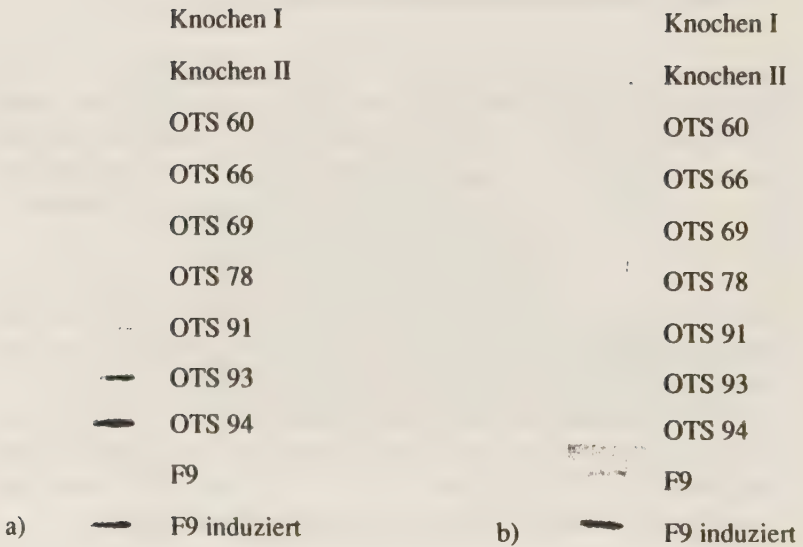


Abbildung 9:

Slot Blot mit Balb/c RNS von Knochentumoren und normalem Knochengewebe.
Hybridisierung mit a) Typ II IAP und b) Aktin.

<u>Gewebe</u>	<u>Faktor der Expression</u>
Knochen I	0,54
Knochen II	0,44
OTS 94	0,2
OTS 93	1,4
OTS 91	0,6
OTS 78	0,8
OTS 69	0,8
OTS 66	1,2
OTS 60	0,6

Tabelle 4:

Expression von Typ II IAP in Balb/c Tumoren.

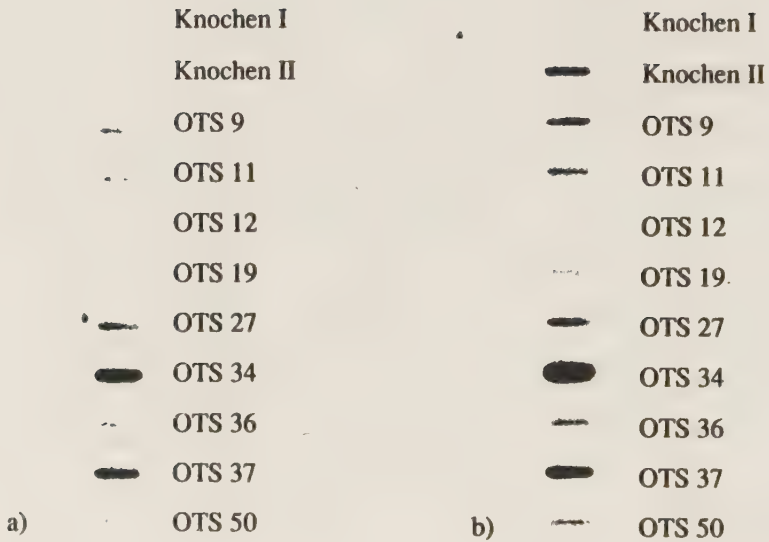


Abbildung 10:

Slot Blot mit NMRI RNS von Knochentumoren und normalem Knochengewebe. Hybridisierung mit a) Typ II IAP und b) Aktin.

<u>Gewebe</u>	<u>Faktor der Expression</u>
Knochen I	1,59
Knochen II	0,69
OTS 50	1,1
OTS 37	<u>3,2</u>
OTS 36	1,2
OTS 34	<u>2,3</u>
OTS 27	1,4
OTS 19	0,6
OTS 12	0,6
OTS 11	0,8
OTS 9	1,7

Tabelle 5:

Expression von Typ II IAP in NMRI Tumoren. Die beiden Tumoren mit erhöhter Expression sind markiert.

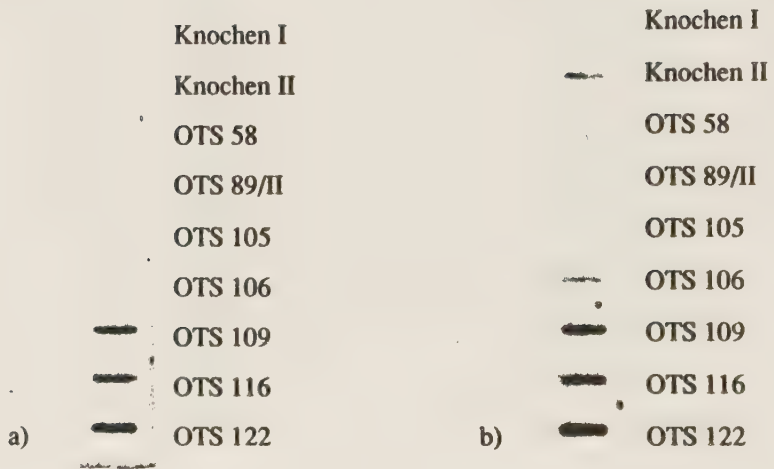


Abbildung 11:

Slot Blot mit CBA RNS von Knochentumoren und normalem Knochengewebe.
Hybridisierung mit a) Typ II IAP und b) Aktin.

<u>Gewebe</u>	<u>Faktor der Expression</u>
Knochen I	1,52
Knochen II	0,87
OTS 122	1,5
OTS 116	1,1
OTS 109	1,3
OTS 106	0,6
OTS 105	0,8
OTS 89/II	0,6
OTS 58	0,5

Tabelle 6:

Expression von Typ II IAP in CBA Tumoren.

4.2. Transkriptlängen der IAP

Zur Bestimmung der Transkriptlängen in der Northern Blot Analyse wurden 6 Balb/c Tumoren (OTS 94, OTS 93, OTS 78, OTS 69, OTS 66 und OTS 60), 4 NMRI Tumoren (OTS 9, OTS 11, OTS 27 und OTS 36) und 4 CBA Tumoren (OTS 105, OTS 106, OTS 109 und OTS 122) verwendet. Als Vergleichsgewebe wurden Milz-, Thymus- und Knochen-RNS von Balb/c Mäusen, Knochen-RNS von NMRI und CBA Mäusen (zwei Proben von Mäusen unterschiedlichen Alters) verwendet. Als weitere Kontrolle diente RNS von unbehandelten und mit Retinolsäure induzierten F9 Zellen, da die Länge der Transkripte, die diese Zellen exprimieren, aus der Literatur bekannt waren.

4.2.1. Hybridisierung mit der Typ I IAP Probe

Balb/c: In Thymus, Milz und Knochen traten jeweils zwei deutliche Transkripte von 5,4 bzw. 7,2 kb auf. Das 5,4 kb Transkript war deutlich stärker als das 7,2 kb Transkript. Die 7,2 kb Bande war zwar schwach, aber in Thymus und Knochen noch eindeutig zu erkennen. In der Milz war das 7,2 kb Transkript undeutlich.

In den Tumoren OTS 60, OTS 66, OTS 69, OTS 78 und OTS 94 waren dieselben Transkriptlängen nachweisbar wie im Normalgewebe. Bei OTS 93 konnte die 5,4 kb Bande nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Das 7,2 kb Transkript stellte in den Osteosarkomen die stärkere Bande. Hier war das 5,4 kb Transkript teilweise (OTS 60, OTS 66, OTS 69 und OTS 78) nur schwer zu erkennen.

NMRI: Im Knochen traten wieder zwei Transkripte von 5,4 bzw. 7,2 kb auf. Die Mengenunterschiede der Transkripte waren nicht so groß wie bei den Balb/c Kontrollgeweben.

In OTS 9, OTS 27 und OTS 36 wurden ebenfalls zwei Transkripte mit 5,4 und 7,2 kb gefunden. In OTS 11 konnte keines der beiden Transkripte nachgewiesen werden. Ein deutlicher Mengenunterschied trat nur bei OTS 36 auf: das 7,2 kb Transkript war stärker als die kleinere 5,4 kb Bande. Bei OTS 9 und OTS 27 waren die beiden Banden in etwa gleichen Mengen vorhanden.

CBA: Im Knochen der ausgewachsenen Maus war nur die 5,4 kb Bande nachweisbar. In allen vier untersuchten Tumoren (OTS 105, OTS 106, OTS 109 und OTS 122) kamen beide Transkripte vor. In OTS 105 und OTS 106 war die 7,2 kb Bande nur schwer nachzuweisen. In OTS 109 und OTS 122 traten die beiden Banden in etwa den gleichen Mengen auf.

Die Vergleichszelllinie F9 war aus Platzgründen bei diesem Northern Blot mit aufgetragen worden. In den behandelten wie in den unbehandelten Zellen konnten sowohl das 5,4 kb wie auch das 7,2 kb Transkript gefunden werden. Das 5,4 kb Transkript war bei weitem stärker als das sehr schwache 7,2 kb Transkript.

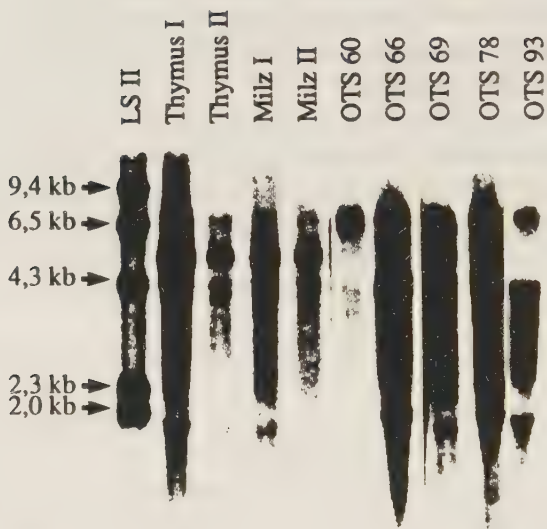


Abbildung 12:

Northern Blot mit RNS von Balb/c Tumoren und Normalgeweben. Hybridisierung mit Typ I spezifischer IAP-Probe. Exposition über 1 Tag (OTS 60, 66 und 93) bzw. 5 Tage (Thymus, Milz, OTS 69 und 78). Die Größe der Transkripte wurde anhand des Längenstandard II (LS II) bestimmt.

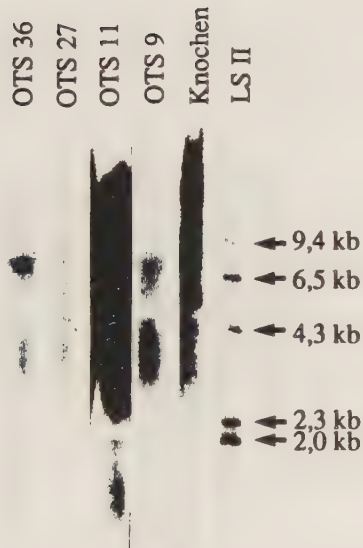


Abbildung 13:

Northern Blot mit RNS von NMRI Tumoren und normalem Knochengewebe. Hybridisierung mit der Typ I IAP Probe. Exposition über 1 Tag (OTS 11) bzw. über 4 Tage (OTS 9, 27 und 36). Der Längenstandard ist hier rechts gezeigt.

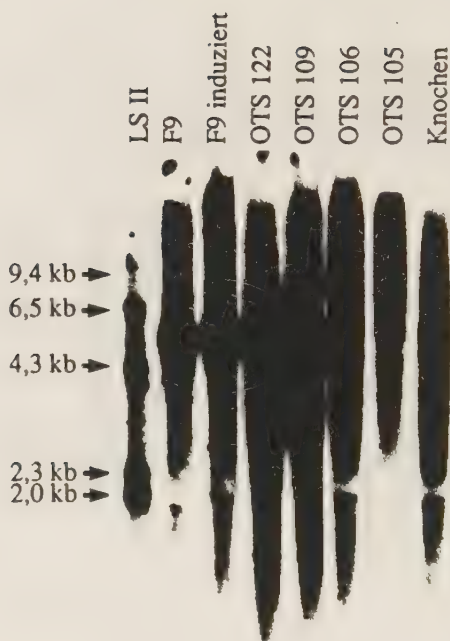


Abbildung 14:

Northern Blot mit RNS von CBA Tumoren und normalem Knochengewebe. Hybridisierung mit der Typ I IAP Probe. Exposition über 1 Tag (OTS 122 und 109) bzw. über 4 Tage (F9 Zellen, OTS 105 und 106, Knochen). Die Kontrollzellen F9 wurden ganz links mit aufgetragen.

4.2.2. Hybridisierung mit der Typ II IAP Probe

Das Ergebnis der Hybridisierung der oben gezeigten Northern Blots mit der für Typ II IAP spezifischen Probe war in allen Fällen negativ. Auf keinem der Autoradiogramme waren spezifische Banden zu sehen. Auch bei Wiederholung des Versuchs konnte kein anderes Ergebnis gefunden werden.

4.3. Verteilung der Proviren im Genom

4.3.1. Verteilung der Typ I IAP-Gene

Mit der Southern Blot-Technik wurden 22 Tumoren der drei Mausstämme untersucht. Neun Tumoren stammten von Balb/c Mäusen (OTS 94, OTS 93, OTS 78, OTS 69, OTS 68, OTS 66, OTS 65, OTS 63 und OTS 44), sieben Tumoren von NMRI Mäusen (OTS 95, OTS 50, OTS 36, OTS 35, OTS 27, OTS 11 und OTS 9) und sechs Tumoren von CBA Mäusen (OTS 122, OTS 116, OTS 109, OTS 106, OTS 105 und OTS 58).

Als Vergleichsgewebe wurde bei Balb/c Leber- und Milz-DNS, bei NMRI Leber-DNS und bei CBA Milz- und Gehirn-DNS aufgetragen.

Balb/c: In den untersuchten Geweben traten fünf verschiedene Banden auf: 5,2 kb, 4,2 kb, 2,8 kb, 1,7 kb und 1,2 kb. In drei der Tumoren trat zusätzlich eine Bande von 3,3 kb auf und zwar in OTS 94, OTS 69 und OTS 63.

NMRI: Die untersuchten NMRI Gewebe zeigten dasselbe Bandenmuster wie die Balb/c Gewebe. In allen traten die gleichen fünf Banden auf mit 5,2 kb, 4,2 kb, 2,8 kb, 1,7 kb und 1,2 kb.

CBA: In den untersuchten CBA Tumoren wurden ebenfalls fünf Banden von jeweils 5,2 kb, 4,2 kb, 2,8 kb, 1,7 kb und 1,2 kb gefunden.

<u>Gewebe</u>	<u>DNS Fragmente in kb</u>					
Milz	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	
Leber	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	
OTS 94	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	<u>3,3</u>
OTS 93	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	
OTS 78	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	
OTS 69	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	<u>3,3</u>
OTS 68	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	
OTS 66	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	
OTS 65	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	
OTS 63	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	<u>3,3</u>
OTS 44	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2	

Tabelle 7:

Bandenmuster des Southern Blots von Balb/c Tumor DNS bei Hybridisierung mit Typ I IAP.

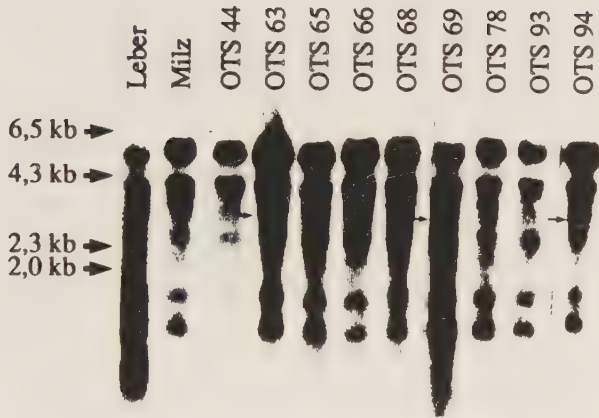


Abbildung 15:

Bandenmuster des Southern Blots von Balb/c Tumor DNS bei Hybridisierung mit Typ I IAP. Exposition über eine halbe Stunde (Leber, Milz, OTS 44, 63, 65, 66, 68 und 94) bzw. über zwei Stunden (OTS 69, 78 und 93). Die in den Osteosarkomen OTS 94, OTS 69 und OTS 63 zusätzlich aufgetretenen Banden sind gekennzeichnet.

<u>Gewebe</u>	<u>DNS Fragmente in kb</u>				
Leber	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 95	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 50	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 36	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 35	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 27	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 11	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 9	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2

Tabelle 8:

Bandenmuster des Southern Blots von NMRI Tumor DNS bei Hybridisierung mit Typ I IAP.



Abbildung 16:

Bandenmuster des Southern Blots von NMRI Tumor DNS bei Hybridisierung mit Typ I IAP.

<u>Gewebe</u>	<u>DNS Fragmente in kb</u>				
Gehirn	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
Milz	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 122	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 116	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 109	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 106	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 105	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2
OTS 58	5,2	4,2	2,8	1,7	1,2

Tabelle 9:

Bandenmuster des Southern Blots von CBA Tumor DNS bei Hybridisierung mit Typ I IAP.

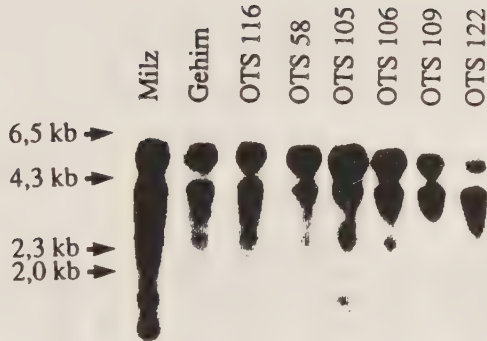


Abbildung 17:

Bandenmuster des Southern Blots von CBA Tumor DNS bei Hybridisierung mit Typ I IAP. Exposition über eine halbe Stunde (Milz, OTS 116, 105, 106, 109 und 122) bzw. über zwei Stunden (Gehirn und OTS 58).

4.3.2. Verteilung der Typ II IAP-Gene

Nach der Untersuchung auf Typ I IAP-Gene wurde an denselben 22 Tumoren und den Vergleichsgeweben die Verteilung von Typ II IAP-Genen bestimmt. Für alle Tumoren ergab sich ein identisches Bandenmuster. Wieder traten fünf Banden auf mit jeweils 4,7 kb, 3,3 kb, 2,7 kb, 2,3 kb und 1,3 kb.

<u>Gewebe</u>	<u>DNS Fragmente in kb</u>				
Leber	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
Milz	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 44	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 63	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 65	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 66	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 68	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 69	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 78	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 93	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 94	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3

Tabelle 10:

Bandenmuster des Southern Blots mit Balb/c DNS bei Hybridisierung mit der Typ II spezifischen IAP Probe.

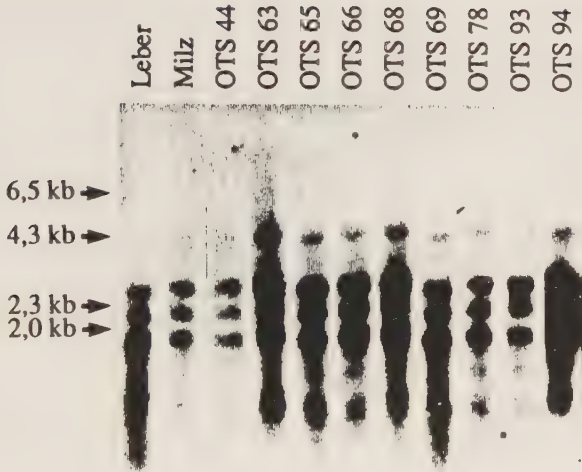


Abbildung 18:

Bandenmuster des Southern Blots mit Balb/c DNS bei Hybridisierung mit der Typ II spezifischen IAP Probe. Exposition über zwei Tage (Leber, Milz, OTS 44, 63, 65, 66, 68 und 94) bzw. über 5 Tage (OTS 69, 78 und 93).

<u>Gewebe</u>	<u>DNS Fragmente in kb</u>				
Leber	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 9	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 11	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 27	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 35	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 36	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 50	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 95	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3

Tabelle 11:

Bandenmuster des Southern Blots mit NMRI DNS bei Hybridisierung mit der Typ II IAP spezifischen Probe.

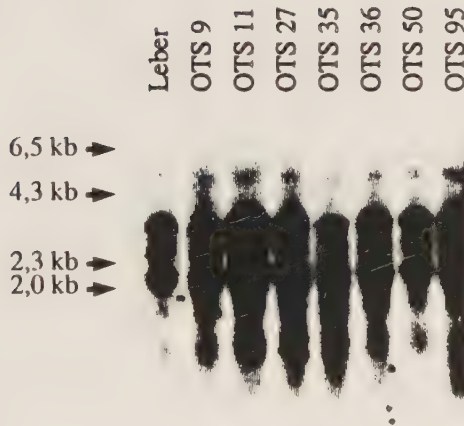


Abbildung 19:

Bandenmuster des Southern Blots mit NMRI DNS bei Hybridisierung mit der Typ II IAP spezifischen Probe.

<u>Gewebe</u>	<u>DNS Fragmente in kb</u>				
Milz	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
Gehirn	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 116	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 58	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 105	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 106	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 109	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3
OTS 122	4,7	3,3	2,7	2,3	1,3

Tabelle 12:

Bandenmuster des Southern Blots mit CBA DNS bei Hybridisierung mit der Typ II IAP spezifischen Probe.

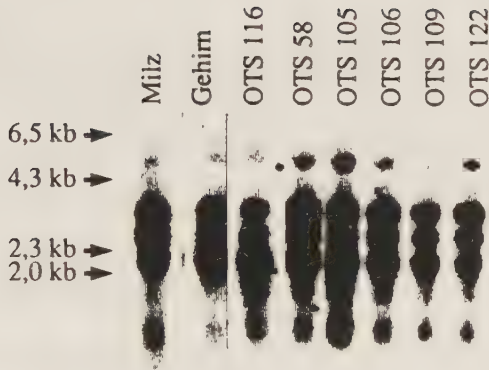


Abbildung 20:

Bandenmuster des Southern Blots mit CBA DNS bei Hybridisierung mit der Typ II IAP spezifischen Probe. Exposition über zwei Tage (Milz, OTS 116, 105, 106, 109 und 122) bzw. über 5 Tage (Gehirn und OTS 58).

5. Diskussion

5.1. Höhe der IAP Expression

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Expression der intrazisternalen A-Partikel und ihre Verteilung im Genom in einigen der strahleninduzierten Osteosarkomen gegenüber dem normalen Gewebe verändert ist.

In den untersuchten Normalgeweben wurde die höchste IAP Genexpression bei Balb/c und NMRI Mäusen im Thymus und im Gehirn gefunden. Die Expression war in beiden Geweben um mindestens das 2fache höher als in Milz, Leber und Knochen. Bei CBA Mäusen dagegen war die Expression in allen Vergleichsgeweben etwa gleich hoch, nur in der Leber wurde eine nur etwa halb so hohe Expression wie in den übrigen Geweben gefunden.

KUFF und FEWELL (1985) hatten ebenfalls berichtet, daß im Thymus verschiedener Labormausstämme die IAP Expression weit höher ist als in Leber, Milz und Niere. Sie fanden jedoch eine um das 5-10fache höhere Expression im Thymus als in den anderen Normalgeweben. Ein so großer Unterschied wurde bei dem hier untersuchten Material nicht gefunden. Die gleichen Autoren untersuchten zusätzlich RNS aus Gehirn, Speicheldrüse, Nebenhoden und Milchdrüse der Balb/c Maus. Sie gingen dabei aber nicht auf die Höhe der Expression ein. Die hohe Expression, die in der vorliegenden Arbeit im Gehirn gefunden wurde, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

Die Balb/c Maus zeigt von den drei untersuchten Mausstämmen die geringste IAP Expression in den Normalgeweben. Im Vergleich zu verschiedenen anderen Labormausstämmen sind die IAP Gene bei der Balb/c Maus zwar ziemlich hoch exprimiert (KUFF und FEWELL 1985), für NMRI und CBA Mäuse liegen jedoch in der Literatur keine Daten vor. Nach den vorliegenden Ergebnissen exprimieren diese beiden Mausstämme aber deutlich mehr IAP RNS als Balb/c Mäuse.

Bei den Werten für die IAP Expression in den Geweben der NMRI Maus wich der Wert für den Knochen des erwachsenen Tieres extrem von sämtlichen anderen Kontrollgeweben ab. Da vermutet wurde, daß diese starke Erhöhung der

Expression auf ein Artefakt zurückzuführen ist, wurde dieser Wert nicht zum Vergleich mit den Osteosarkomen herangezogen.

Die höchste IAP Expression in allen Normalgeweben trat bei der CBA Maus auf. Hier war die Expression im normalen Knochen um das 2fache höher als bei der NMRI Maus und sogar um das 4fache höher als bei der Balb/c Maus.

Das Verhältnis der Expressionsstärke in den einzelnen Normalgeweben war bei Balb/c und NMRI in etwa gleich. Im Knochen liegt die Expression relativ niedrig. Bei diesen beiden Mausstämmen liegt sie sogar noch unter der Expression in der Milz.

Vergleicht man nun die Expressionswerte für die verschiedenen Osteosarkome mit denen der Normalgewebe, so ergibt sich bei 25 von 27 Tumoren (das entspricht 92,5 %) kein auffälliger Befund, wenn man sämtliche Normalgewebe zum Vergleich heranzieht. Für Osteosarkome muß aber wohl der normale Knochen als Vergleichsgewebe herangezogen werden.

Vier der sieben untersuchten Balb/c Tumoren (das entspricht 57 %) hatten eine mehr als doppelt so hohe IAP Expression wie die beiden normalen Knochenproben. Die IAP Expression von drei dieser vier Tumoren lag nur um etwa das 2fache höher als im normalen Knochen und erreichte damit die Werte für Thymus und Gehirn. Berücksichtigt man, daß in einem Transplantatmyelom und in einer Neuroblastomzelllinie Expressionen von IAP gefunden wurden, die um mehr als das 15fache über der des Balb/c Thymus lagen (KUFF und FEWELL 1985), erscheint es fraglich, ob diese geringfügige Erhöhung von Bedeutung ist. Das einzige Balb/c Osteosarkom mit einer deutlichen Expressionserhöhung war der Tumor OTS 93. Hier wurde fast 9mal so viel IAP RNS exprimiert wie im normalen Knochen und damit immerhin noch 4mal soviel wie in sämtlichen Normalgeweben. Dieser Tumor war auch der einzige der Balb/c Tumoren, der metastasiert hatte. Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung des betreffenden Tieres wurde eine solitäre Osteosarkometastase von 3x2 mm in der Milz gefunden (LUZ, persönliche Mitteilung). Da in der Literatur nur Tumorzelllinien oder Tumor-Transplantatlinien beschrieben werden, gibt es leider keine Ergebnisse, die mit dem oben genannten Befund vergleichbar wären.

Noch weniger als sämtliche Normalgewebe exprimierte OTS 78. In diesem Osteosarkom wurde nur etwa die Hälfte der IAP Expression des normalen Knochens

erreicht. Bei der Untersuchung mit der Typ II spezifischen Probe lag dieser Tumor in der Expression doch etwas höher als der normale Knochen. So scheinen bei diesem Tumor die von der Anzahl her weit selteneren IAP Typ II Gene aktiver zu sein als die Typ I Gene. Bei den anderen Balb/c Tumoren lag die Expression der Typ II Gene im Bereich des normalen Knochens oder sogar noch darunter.

In zwei Myelomen, MOPC 104E und MOPC 315, stammt dagegen der hauptsächliche Anteil der IAP RNS von Typ II Genen (SHEN-ONG und COLE 1982). Die Autoren zogen aus weiteren Untersuchungen den Schluß, daß in jedem Tumor wohl nur wenige der IAP Gene transkribiert werden (SHEN-ONG und COLE 1984). Bei den hier untersuchten Osteosarkomen handelt es sich bei den hauptsächlich transkribierten Genen offensichtlich immer um Typ I Gene.

Bei der NMRI Maus ist bereits das Ausgangsniveau der IAP Expression im Normalgewebe höher als bei der Balb/c Maus. Bei fünf der neun untersuchten NMRI Osteosarkome (das entspricht 55 %) war die IAP Expression mehr als doppelt so hoch wie im normalen Knochen. Da hier aber auch Thymus und Gehirn bereits mehr als doppelt so viel IAP RNS exprimieren, stellt sich wiederum die Frage nach der Bedeutung einer so geringen Expressionserhöhung.

Interessanterweise wurde bei zwei der fünf auffälligen Tumoren eine Metastase gefunden. Bei OTS 36 handelte es sich um multiple Osteosarkommetastasen in der Leber, bei OTS 37 wurden ebenfalls multiple Metastasen in der Lunge gefunden (LUZ, persönliche Mitteilung).

Auch bei der NMRI Maus lag ein einzelner Tumor (OTS 12) in der IAP Expression um die Hälfte niedriger als der normale Knochen und damit im Bereich, der für die RNS der Leber bestimmt worden war. Im Gegensatz zum Balb/c Tumor OTS 78 war OTS 12 aber auch bei der Typ II IAP Hybridisierung unauffällig. Hier blieben alle NMRI Tumoren bis auf OTS 37 und OTS 34 unter oder im Bereich des Wertes für den normalen Knochen. OTS 37 dagegen hatte auch hier eine um mehr als das 3fache erhöhte IAP Expression, OTS 34 immerhin noch eine um mehr als das 2fache Expression. In OTS 37 scheinen also beide IAP Typen aktiviert worden zu sein, im OTS 34 dagegen nur die Typ II IAP Gene.

Bei der CBA Maus hatten von sieben untersuchten Tumoren zwei eine IAP Expression, die der im Normalgewebe entsprach. Die anderen fünf lagen zum Teil

bedeutend darunter. OTS 105, OTS 89/II und OTS 58 erreichten nicht die Höhe der IAP Expression in der Leber.

Bei der Untersuchung mit der Typ II Sonde blieben alle CBA Tumoren unauffällig. Weder eine erhöhte noch eine auffallend niedrige Expression waren hier festzustellen.

Ein Vergleich der drei Mausstämmen untereinander ist wegen der sehr unterschiedlichen Expressionshöhe in den jeweiligen Normalgeweben schwierig. Die Entscheidung, ob eine Erhöhung der IAP Genexpression vorlag oder nicht, wurde deshalb nur im Hinblick auf die Werte des normalen Knochens des entsprechenden Mausstammes getroffen.

Eine eindeutig höhere IAP Expression haben letztlich nur OTS 93 und OTS 37. Beide Tumoren haben metastasiert. Die Untersuchung einer größeren Anzahl von Osteosarkomen könnte diesen vagen Hinweis auf einen Trend zur Metastasierung bei Osteosarkomen mit erhöhter IAP Expression klären. Auch wenn kein ursächlicher Zusammenhang besteht, könnte doch die Erhöhung der IAP Expression als Marker für einen besonders malignen Tumor dienen.

5.2. IAP Transkripte

In allen Normalgeweben der Balb/c Maus und der NMRI Maus traten zwei Transkripte von 7,2 kb und 5,4 kb auf. Bei der CBA Maus war nur das kleinere 5,4 kb Transkript nachweisbar. Auch in der Literatur wurden immer diese beiden Transkripte in Geweben verschiedener Inzuchtstämmen gefunden. In RNS aus Thymus, Gehirn, Speicheldrüse, Nebenhoden und Milchdrüse traten Transkript von jeweils 7,2 kb und 5,4 kb auf (KUFF und FEWELL 1985).

Das 5,4 kb Transkript war in den untersuchten Normalgeweben immer deutlich stärker exprimiert als das 7,2 kb Transkript, wobei der Mengenunterschied der Transkripte bei der Balb/c Maus größer war als der bei der NMRI Maus. Auch diese stärkere Expression des kleineren Transkripts ist in der Literatur beschrieben (KUFF und FEWELL 1985, GROSSMAN et al. 1987). In isolierten intrazisternalen A-Partikeln kann spezifische RNS in verschiedenen Größen von 7,2 kb bis 3,5 kb nachgewiesen werden (ONO et al. 1980, PATERSON et al. 1978, SHEN-ONG und COLE 1984). Die kürzeren Transkripte unter 5,4 kb bis 3,5 kb stammen wahrscheinlich von Typ II IAP Genen (ONO et al. 1980, SHEN-ONG und COLE

1984). In den normalen Geweben wurden aber bisher nur das 7,2 kb und das 5,4 kb Transkript gefunden.

Das 7,2 kb Transkript kodiert für das Hauptstrukturprotein der IAP, p73, das dem Vorläuferprotein des *gag*-Produkts von Retroviren entspricht (DICKSON et al. 1982). Das kleinere 5,4 kb Transkript stellt das Produkt eines deletierten IAP Genoms dar und kodiert für eine Gruppe von Polypeptiden mit einem Molekulargewicht zwischen 114 und 120 kD (KUFF und FEWELL 1985). Diese *gag-pol*-Fusionsproteine (GROSSMAN et al. 1987) sind keine Vorläuferproteine von p73. Ihre Funktion ist nicht bekannt. Man weiß aber von einigen IAP Genen, daß sie für Proteine mit einer biologischen Funktion kodieren, nämlich für Bindungsfaktoren des Immunglobulins E (MARTENS et al. 1985, 1987, MOORE et al. 1986). Es wäre denkbar, daß das Produkt des 5,4 kb Transkripts ebenfalls eine biologische Funktion in der Zelle hat, die bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Möglicherweise spielen sie eine Rolle bei der Differenzierung während der Entwicklung, weil auch in der Embryo-RNS (CHRISTY et al. 1985) und in embryonalen Teratokarzinomzelllinien (HOJMAN MONTES DE OCA et al. 1983) die 5,4 kb Bande am stärksten exprimiert wird. Der Stärke der Transkripte entsprechend kann das jeweilige Protein im Gewebe nachgewiesen werden. Dort, wo das 7,2 kb Transkript am stärksten exprimiert wird und daher auch viel p73 nachgewiesen werden kann, werden in der Regel auch A-Partikel gefunden (KUFF und FEWELL 1985). So kann das Vorkommen von intrazisternalen A-Partikeln im normalen Knochengewebe von NMRI Mäusen erklärt werden (MARQUART 1976), denn bei diesem Mäusestamm wird auch das 7,2 kb Transkript im Normalgewebe relativ stark exprimiert.

Bei der Balb/c Maus können im Normalgewebe auch A-Partikel gefunden werden (WIVEL und SMITH 1971), sie sind aber extrem selten. Das 7,2 kb Transkript wird auch nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert.

Andere Transkripte als 5,4 kb und 7,2 kb konnten in keinem der untersuchten Osteosarkome nachgewiesen werden. Auch in der Literatur sind diese beiden Transkripte die häufigsten in vielen der untersuchten Tumoren und Tumorzelllinien: in Neuroblastomzellen (PATERSON et al. 1978), in einem Balb/c Lymphom (KUFF und FEWELL 1985) und in den Myelomen MOPC 315 und TEPC15 (MORGAN und HUANG 1984, WUJCIK et al. 1984). Bei diesen beiden

Myelomen trat noch ein drittes Transkript von 3,8 kb auf, das 5,4 kb Transkript dominierte aber.

In den Balb/c Tumoren war einheitlich die 7,2 kb Bande die stärker exprimiert. Daß bei OTS 93 die 5,4 kb Bande kaum noch nachweisbar war, zeigt, daß in diesem Tumor die IAP Genexpression nicht nur erhöht ist, sondern auch ein anderes Transkript als im Normalgewebe bevorzugt exprimiert wird.

In drei der vier untersuchten NMRI Tumoren wurden ebenfalls die beiden Transkripte mit 7,2 kb und 5,4 kb gefunden. In OTS 9 und OTS 27 waren die zwei Transkripte in etwa gleichen Mengen vorhanden. Das Ergebnis entsprach damit in etwa den Verhältnissen im Normalgewebe. Nur bei OTS 36 war das 7,2 kb Transkript deutlich stärker exprimiert als das 5,4 kb Transkript.

Die Ergebnisse bei der CBA Maus entsprachen den Erwartungen aufgrund der unveränderten IAP Expression in den Tumoren gegenüber dem Normalgewebe: es kamen zwar auch hier beide Transkripte vor, bei OTS 105 und OTS 106 war aber das 7,2 kb Transkript nicht ganz eindeutig nachzuweisen. Bei OTS 109 und OTS 122 wurden die zwei Transkripte in etwa gleichen Mengen exprimiert.

Diese Verschiebung der Expressionstärke zum 7,2 kb Transkript hin ist auch bei anderen Tumoren und Tumorzelllinien beobachtet worden: in Neuroblastomzellen und in einem Lymphom war das 7,2 kb Transkript das am stärksten exprimierte (PATERSON et al. 1978, KUFF und FEWELL 1985). Kleinere Transkripte wie das 4,7 kb und 4,0 kb Transkript in der RNS eines Myeloms sind sonst sehr selten (KUFF und FEWELL 1985) und konnten bei den Osteosarkomen nicht gefunden werden. Da dies Typ II spezifische Transkripte sind, sind diese IAP Gene bei dem hier untersuchten Material nicht transkriptional aktiv.

5.3. Verteilung der Proviren in der DNS

Der Verdau mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Hind III ergab bei den Normalgeweben aller drei Mausstämme eine einheitliche Reihe von Fragmenten mit je 5,2 kb, 4,2 kb, 2,8 kb, 1,7 kb und 1,2 kb. KUFF et al. (1981) hatten beim Verdau von genomischer Maus DNS verschiedener Laborstämme ein konstantes Muster von Banden zwischen 5,7 kb und 1,0 kb gefunden. Als Hauptbanden sahen sie die Fragmente mit 5,7 kb, 5,2 kb, 4,2 kb und 3,7 kb an. Zwei dieser Fragmente konnten auch im hier untersuchten Normalgewebe nachgewiesen werden, nämlich 5,2 kb und

4,2 kb. Die größte dieser vier Hauptbanden fehlte in sämtlichen Normalgeweben. Das kann ebenso wie die kleineren Fragmente zwischen 3 und 1 kb durch eine zusätzliche interne Eco RI Schnittstelle bedingt sein (KUFF et al. 1981). Da 76 % der IAP Gene ein identisches Restriktionsmuster haben (KUFF et al. 1980, 1981), ist verständlich, daß diese 5,7 kb Bande in sämtlichen untersuchten Geweben fehlt. Auch HOJMAN MONTES DE OCA et al. (1983) fanden hauptsächlich Fragmente bis zu einer Größe von 5,5 kb, konnten also die bei KUFF et al. beschriebene 5,7 kb Bande ebenfalls nicht nachweisen.

Andererseits handelt es sich bei der 2,8 kb Bande, die in allen Geweben sehr deutlich zu finden war, wahrscheinlich um eine Deletionsvariante eines 5,8 kb Fragments (SHEN-ONG und COLE 1982).

Die fünf Hauptfragmente, die bei der Hybridisierung mit der Typ II IAP spezifischen Probe auftraten, weichen von den Angaben in der Literatur leicht ab. In den Normalgeweben der drei Mausstämmen wurden Fragmentlängen von 4,7 kb, 3,3 kb, 2,7 kb, 2,3 kb und 1,3 kb gefunden. LUEDERS und MIETZ (1986) und SHEN-ONG und COLE (1982) dagegen geben 3,5 kb, 2,8 kb und 2,1 kb als Größen für die Typ II spezifischen Fragmente an. Bei der 4,7 kb Bande kann es sich von der Größe her nur um ein Fragment einer Typ I Gens handeln. Hier haben wahrscheinlich die Sequenzen der Typ II Probe hybridisiert, die auch in Typ I Genen vorkommen (LUEDERS 1987). Das kleinste Fragment stammt vermutlich von einer zusätzlichen internen Restriktionsstelle.

Auch in den Osteosarkomen der drei Mausstämmen Balb/c, NMRI und CBA war das Muster der fünf Fragmente sowohl bei der Typ I als auch bei der Typ II IAP Hybridisierung regelmäßig vorhanden.

Bei drei der Balb/c Tumoren trat eine zusätzliche Bande von 3,3 kb bei der Hybridisierung mit der Typ I Probe auf. Zwar war eine 3,3 kb Bande bei allen untersuchten Tumoren und Normalgeweben bei der Hybridisierung mit der Typ II IAP Probe aufgetreten, aber bei den betreffenden Tumoren OTS 94, OTS 69 und OTS 63 hat hier offensichtlich ein deletiertes Typ I IAP Element neu inseriert. Hätte die Typ I Probe aufgrund gemeinsamer Sequenzen mit einem Typ II spezifischen Fragment hybridisiert, wäre diese Bande in allen anderen Geweben ebenfalls aufgetreten. Die Frage, ob es sich um eine Transposition eines bereits im Genom vorhandene IAP Elements handelt oder um eine echte Neintegration, kann aus den

vorliegenden Daten nicht sicher beantwortet werden. Bisher konnte noch keine durch reverse Transkription entstandene IAP DNS nachgewiesen werden (SHEN-ONG und COLE 1982). Die Autoren zogen daraus den Schluß, daß eine Neuintegration wahrscheinlich ein seltenes Ereignis darstellt. Integrierte IAP-Sequenzen weisen die Merkmale integrierter Proviren auf bis hin zur Wiederholung wirtsspezifischer Sequenzen am Ende des proviralen Genoms (Literatur bei COLE et al. 1981, KUFF et al 1983).

Abschließend ist festzustellen, daß mit den vorliegenden Daten eine Beteiligung der intrazisternalen A-Partikel an der Entstehung der Osteosarkome nicht nachgewiesen werden konnte. Die Erhöhung der Expression von IAP Genen in sieben der 23 untersuchten Osteosarkome (das entspricht 30 %) gegenüber dem normalen Knochen war in fünf Fällen zu geringfügig, um als signifikant gewertet zu werden. Auch die IAP Expression der beiden Tumoren OTS 93 und OTS 37 reicht bei weitem nicht an die Expressionserhöhung heran, die in Myelomen und Neuroblastomzellen gefunden wurden (KUFF und FEWELL 1985). Die Beobachtung, daß drei der sieben Tumoren mit erhöhter IAP Expression metastasiert hatten, kann als Hinweis darauf gelten, daß ein Trend zur Metastasierung von einer erhöhten IAP Expression begleitet ist. Hier wäre aber die Untersuchung weiteren Materials zur Absicherung einer solchen Korrelation unbedingt erforderlich.

Die teilweise beobachtete Verschiebung der Transkriptmengen in Richtung des 7,2 kb Transkripts wurde zwar auch bei einem Lymphom und einer Neuroblastomzelllinie beschrieben, aber das Verhältnis der beiden Transkripte von 7,2 kb und 5,4 kb kann je nach Art des Tumors variieren, von dem die IAP RNS stammt (KUFF und FEWELL 1985).

Schließlich wiesen die Tumoren mit der zusätzlichen 3,3 kb Bande bei den anderen Untersuchungen keine besonderen Eigenschaften auf. Zwar war auch bei diesen Tumoren das 7,2 kb Transkript das stärkere, die Höhe der IAP Expression war jedoch nicht oder nur unbedeutend erhöht. Sollte es sich bei dieser neu aufgetretenen Bande aber tatsächlich um eine Neuintegration handeln, wäre die Möglichkeit einer Beteiligung eines IAP Elements an der Tumorentstehung nicht auszuschließen. Eine Aktivierung der IAP Gene könnte durch die ionisierende Strahlung erfolgt sein. Ein

neu integriertes IAP Element könnte zum Beispiel durch Änderungen der Funktion spezifischer Promotor- und Enhancer-Elemente oder die Aktivierung oder Inaktivierung von Genen einen Beitrag zur Entwicklung maligner Tumorzellen leisten (HSIAO et al. 1986) und so bei den untersuchten Osteosarkomen die Tumorentstehung zumindest begünstigt haben.

6. Zusammenfassung

Die Expression von intrazisternalen A-Partikeln (IAP) und die Verteilung der Gene der beiden Subtypen Typ I IAP und Typ II IAP wurde in strahleninduzierten Osteosarkomen von Balb/c, NMRI und CBA Mäusen untersucht.

Die Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Slot Blot Analyse zeigte, daß 9 von 23 (das entspricht 39 %) der untersuchten Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe eine erhöhte IAP Expression hatten. Kein einziger der CBA Tumoren war in der IAP Expression erhöht - nur Tumoren der beiden Stämme Balb/c und NMRI exprimierten vermehrt IAP RNS.
2. Die Northern Blot Analyse der Osteosarkom-RNS zeigte, daß die zwei IAP Transkripte (7,2 kb und 5,4 kb) in diesen Tumoren ebenso wie im Normalgewebe auftraten. Einige der Tumoren exprimierten mehr von dem 7,2 kb Transkript im Vergleich zum Normalgewebe. Dieses 7,2 kb Transkript kodiert für das Hauptstrukturprotein p73 der IAP.
3. Bei der Hybridisierung der Southern Blots von Maus DNS mit der Typ I spezifischen Probe trat in drei der untersuchten Balb/c Tumoren ein neues Fragment auf.
4. Obwohl die ursächliche Beteiligung der IAP an der Entstehung der Osteosarkome nicht nachgewiesen werden konnte, deuten die Veränderungen der IAP Expression und die neu aufgetretenen Fragmente auf eine mögliche Korrelation zur weiteren Tumorentwicklung hin. So könnte die IAP Expression als Marker für den Malignitätsgrad eines Tumors dienen.

Summary

EXPRESSION OF INTRACISTERNAL A-PARTICLES IN RADIATION-INDUCED MURINE OSTEOSARCOMAS

The expression of intracisternal A-type particles (IAPs) and the distribution of the corresponding type I and type II genes was investigated in radiation induced osteosarcomas of Balb/c, NMRI and CBA mice.

The results can be summarized as follows:

1. Slot blot analysis showed that 9 out of 23 (i.e. 39 %) of the examined tumours had enhanced IAP expression as compared to normal tissues. None of the CBA tumours were enhanced in IAP expression - only tumours of the strains Balb/c and NMRI expressed higher levels of IAP RNA.
2. Northern blot analysis of RNA from osteosarcomas revealed that the two IAP transcripts (7.2 kb and 5.4 kb) had the same mobility in these tissues as in normal tissue. Some tumours showed a higher level of expression of the 7.2 kb transcript as compared to normal tissues. This 7.2 kb transcript encodes the major structural protein p 73 of IAPs.
3. Hybridization of Southern blots of mouse DNA using the IAP type I specific probe revealed a unique fragment in three of the investigated Balb/c osteosarcomas.
4. Although it could not directly be shown that IAPs were involved in the genesis of osteosarcomas, the changes in IAP expression and the unique fragments suggest a possible correlation with tumour progression. In this light the level of IAP expression may serve as a marker for the degree of the malignancy of the tumour.

7. Literaturhinweise

AVIV H., LEDER P. (1972):

Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412

BURT D.W., REITH A.D., BRAMMAR W.J. (1984):

A retroviral provirus closely associated with the *Ren-2* gene of DBA/2 mice.

Nucleic Acids Res. 12, 8579-8593

CALARCO P.G., SZOLLOSI D. (1973):

Intracisternal A particles in ova and preimplantation stages of the mouse.

Nature New Biology 243, 91-93

CALLAHAN R., BENVENISTE R.E., SHERR C.J., SCHIDLOVSKY G.,
TODARO G.J. (1976):

A new class of genetically transmitted retravirus isolated from *Mus cervicolor*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3579-3583

CALLAHAN R., SHERR C.J., TODARO G.J. (1977):

A new class of murine retroviruses: immunological and biochemical comparison of novel isolates from *Mus cervicolor* and *Mus caroli*.

Virology 80, 401-416

CALLAHAN R., KUFF E.L., LUEDERS K.K., BIRKENMEIER E. (1981):

Genetic relationship between the *Mus cervicolor* M432 retrovirus and the *Mus musculus* intracisternal type A particle.

J. Virol. 40, 901-911

CANAANI E., DREAZEN O., KLAR A., RECHAVI G., RAM D., COHEN J.B.,
GIVOL D. (1983):

Activation of the *c-mos* oncogene in a mouse plasmacytoma by insertion of an endogenous intracisternal A-particle genome.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7118-7122

CANAANI E., COHEN J.B., DREAZEN O., HOROWITZ M., UNGER T., KLAR A. (1984):

Transposition of endogenous intracisternal A-particle genomes into the *c-mos* oncogene.

Cancer Cells 2 / Oncogenes and Viral Genes

Cold Spring Harbor Laboratory 1984, 295-301

CHASE D.G., PIKO L. (1973):

Expression of A- and C-type particles in early mouse embryos.

J. Natl. Cancer Inst. 51, 1971-1973

CHIRGWIN J.M., PRZYBYLA A.E., MACDONALD R.J., RUTTER W.J. (1979):

Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.

Biochemistry 18, 5294-5299

CHRISTY R.J., BROWN A.R., GOURLIE B.B., HUANG R.C.C. (1985):

Nucleotide sequences of murine intracisternal A-particle gene LTRs have extensive variability within the R region.

Nucleic Acids Res. 13, 289-303

CHRISTY R.J., HUANG R.C.C. (1988):

Functional analysis of the long terminal repeats of intracisternal A-particle genes: sequences within the U3 region determine both the efficiency and direction of promoter activity.

Mol. Cell. Biol. 8, 1093-1102

COHEN J.B., UNGER T., RECHAVI G., CANAANI E., GIVOL D. (1983):

Rearrangement of the oncogene *c-mos* in mouse myeloma NS1 and hybridomas.

Nature 306, 797-799

COLE M.D., ONO M., HUANG R.C.C. (1981):

Terminally redundant sequences in cellular intracisternal A-particle genes.

J. Virol. 38, 680-687

DALTON A.J. (1972):

RNA tumor viruses - terminology and ultrastructural aspects of virion morphology and replication.

J. Natl. Cancer Inst. 49, 323-325

DICKSON C., EISENMAN R., FAN H., HUNTER E., TEICH N. (1982):

Protein biosynthesis and assembly.

In: RNA tumor viruses.

Cold Spring Harbor Laboratory 1982, 513-648

EDMONDS M., VAUGHN M.H. JR., NAKAZATO H. (1971):

Polyadenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly-labeled polyribosomal RNA of HeLa cells: Possible evidence for a precursor relationship.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1336-1340

FINNEGAN D.J. (1985):

Transposable elements in eukaryotes.

International Review of Cytology 93, 281-326

FRIEDLAENDER M., MOORE D.H., LOVE R., BROWN R.A., KOPROWSKI H. (1955):

Studies with the electron microscope of virus-host relationships in Ehrlich ascites tumor cells. I. The identification and structure of anopheles A virus.

J. Exptl. Med. 102, 361-370

GATTONI S., KIRSCHMEIER P., WEINSTEIN I.B., ESCOBEDO J., DINA D. (1982):

Cellular Moloney murine sarcoma (*c-mos*) sequences are hypermethylated and transcriptionally silent in normal and transformed rodent cells.

Mol. Cell. Biol. 2, 41-51

GATTONI-CELLI S., HSIAO W.L.W., WEINSTEIN I.B. (1983):

Rearranged *c-mos* locus in a MOPC 21 murine myeloma cell line and its persistence in hybridomas.

Nature 306, 795-796

GROSSMAN Z., MIETZ J.A., KUFF E.L. (1987):

Nearly identical members of the heterogenous IAP gene family are expressed in thymus of different mouse strains.

Nucleic Acids Res. 15, 3823-3834

HARDIES S.C., PATIENT R.K., KLEIN R.D., HO F., REZNIKOFF W.S., WELLS R.D. (1979):

Construction and mapping of recombinant plasmids used for the preparation of DNA fragments containing the *Escherichia coli* lactose operator and promoter.

HAWLEY R.G., SHULMAN M.J., HOZUMI N. (1984):

Intracisternal A-particle genes: a family of *cop*ia-like transposable elements in *Mus musculus*.

Cancer Cells 2 / Oncogenes and Viral Genes

Cold Spring Harbor Laboratory 1984, 273-279

HAWLEY R.G., SHULMAN M.J., MURIALDO H., GIBSON D.M., HOZUMI N. (1982):

Mutant immunoglobulin genes have repetitive DNA elements inserted into their intervening sequences.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7425-7429

HOJMAN-MONTES DE OCA F., DIANOUX L., PERIES J., EMANOIL-RAVICOVITCH R. (1983):

Intracisternal A particles: RNA expression and DNA methylation in murine teratocarcinoma cell lines.

J. Virol. 46, 307-310

HOWE C.C., OVERTON G.C. (1986):

Expression of the intracisternal A-particle is elevated during differentiation of embryonal carcinoma cells.

Mol. Cell. Biol. 6, 150-157

HSIAO W.-L. W., GATTONI-CELLI S., WEINSTEIN I.B. (1986):

Effects of 5-azacytidine on expression of endogenous retrovirus-related sequences in C3H 10T1/2 cells.

J. Virol. 57, 1119-1126

HUANG T.T.F. JR., CALARCO P.G. (1981a):

Evidence for the cell surface expression of intracisternal A particle-associated antigens during early mouse development.

Development. Biol. 82, 388-392

HUANG T.T.F. JR., CALARCO P.G. (1981b):

Immunoprecipitation of intracisternal A-particle-associated antigens from preimplantation embryos.

J. Natl. Cancer Inst. 67, 1129-1134

HUANG T.T.F. JR., CALARCO P.G. (1982):

Immunologic relatedness of intracisternal A-particles in mouse embryos and neoplastic cell lines.

J. Natl. Cancer Inst. 68, 643-649

KAKEFUDA T., ROBERTS E., SUNTZEFF V. (1970):

Electron microscopic study of methylcholanthrene-induced epidermal carcinogenesis in mice: mitochondrial dense bodies and intracisternal A-particles.

Cancer Res. 30, 1011-1019

KUFF E.L., LUEDERS K.K., OZER H.L., WIVEL N.A. (1972):

Some structural and antigenic properties of intracisternal A-particles occurring in mouse tumors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 218-222

KUFF E.L., LUEDERS K.K., SCOLNICK E.M. (1978):

Nucleotide sequence relationship between intracisternal type A-particles of *Mus musculus* and an endogenous retrovirus (M432) of *Mus cervicolor*.

J. Virol. 28, 66-74

KUFF E.L., CALLAHAN R., HOWK R.S. (1980):

Immunological relationship between the structural proteins of intracisternal A-particles of *Mus musculus* and the M432 retrovirus of *Mus cervicolor*.

J. Virol. 33, 1211-1214

KUFF E.L., SMITH L.A., LUEDERS K.K. (1981):

Intracisternal A-particle genes in *Mus musculus*: a conserved family of retrovirus-like elements.

Mol. Cell. Biol. 1, 216-227

KUFF E.L., FEENSTRA A., LUEDERS K.K., RECHAVI G., GIVOL D., CANAANI E. (1983a):

Homology between an endogenous viral LTR and sequences inserted in an activated cellular oncogene.

Nature 302, 547-548

KUFF E.L., FEENSTRA A., LUEDERS K.K., SMITH L., HAWLEY R., HOZUMI N., SHULMAN M. (1983b):

Intracisternal A-particle genes as movable elements in the mouse genome.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1992-1996

KUFF E.L., FEWELL J.W. (1985):

Intracisternal A-particle gene expression in normal mouse thymus tissue: gene products and strain-related variability.

Mol. Cell. Biol. 5, 474-483

KUFF E.L., MIETZ J.A., TROUNSTINE M.L., MOORE K.W., MARTENS C.L.
(1986):

cDNA clones encoding murine IgE-binding factors represent multiple
structural variants of intracisternal A-particle genes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6583-6587

LUEDERS K.K., SEGAL S., KUFF E.L. (1977a):

RNA sequences specifically associated with mouse intracisternal A-particles.

Cell 11, 83-94

LUEDERS K.K., KUFF E.L. (1977b):

Sequences associated with intracisternal A-particles are reiterated in the mouse
genome.

Cell 12, 963-972

LUEDERS K.K., LEDER A., LEDER P., KUFF E.L. (1982):

Association between a transposed α -globin pseudogene and retrovirus-like
elements in the BALB/c mouse genome.

Nature 295, 426-428

LUEDERS K.K., FEWELL J.W., KUFF E.L., KOCH T. (1984):

The long terminal repeat of an endogenous intracisternal A-particle gene
functions as a promoter when introduced into eucaryotic cells by transfection.

Mol. Cell. Biol. 4, 2128-2135

LUEDERS K.K., MIETZ J.A. (1986):

Structural analysis of type II variants within the mouse intracisternal A-particle
sequence family.

Nucleic Acids Res. 14, 1495-1510

LUEDERS K.K. (1987):

Specific association between type-II intracisternal A-particle elements and
other repetitive sequences in the mouse genome.

Gene 52, 139-146

LURIA S., HOROWITZ M. (1986):

The long terminal repeat of the intracisternal A-particle as a target for transactivation by oncogene products.

J. Virol. 57, 998-1003

MANDEL M. und HIGA A. (1970):

Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.

J.Mol. Biol. 53, 154-162

MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROCK J. (1982):

Molecular cloning: a laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

MARCIANI D.J., KUFF E.L. (1973):

Isolation and partial characterization of the internal structural proteins from murine intracisternal A-particles.

Biochemistry 12, 5075-5083

MARQUART K.-H. (1974):

Virus-like particles in ²²⁴Ra-induced murine osteosarcomas.

Beitr. Path. Bd. 152, 116-126

MARQUART K.-H. (1976):

Particles in normal bone tissue from various mouse strains.

Calcif. Tiss. Res. 21, 219-223

MARTENS C.L., HUFF T.F., JARDIEU P., TROUNSTINE M.L., COFFMAN R.L.,

ISHIZAKA K., MOORE K.W. (1985):

cDNA clones encoding IgE-binding factors from a rat-mouse Tcell hybridoma.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2460-2464

MARTENS C.L., JARDIEU P., TROUNSTINE M.L., STUART S.G.,

ISHIZAKA K., MOORE K.W. (1987):

Potentiating and suppressive IgE-binding factors are expressed by a single cloned gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 809-813

McMASTER G.K., CARMICHAEL G.G. (1977):

Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamid and agarose gels by using glyoxal and acridine orange.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4835-4838

MOORE K.W., JARDIEU P., MIETZ J.A., TROUNSTINE M.L., KUFF E.L.,
ISHIZAKA K., MARTENS C.L. (1986):

Rodent IgE-binding factor genes are members of an endogenous retrovirus-like gene family.

J. Immunol. 136, 4283-4290

MORGAN R.A., HUANG R.C.C. (1984):

Correlation of undermethylation of intracisternal A-particle genes with expression in murine plasmacytomas but not in NIH/3T3 embryo fibroblasts.

Cancer Res. 44, 5234-5241

MORRISON D.A. (1979):

Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing.

Meth. Enzymol. 68, 326-331

ONO M., COLE M.D., WHITE A.T., HUANG R.C.C. (1980):

Sequence organization of cloned intracisternal A-particle genes.

Cell 21, 465-473

ONO M., OHISHI H. (1983):

Long terminal repeat sequences of intracisternal A particle genes in the Syrian hamster genome: identification fo tRNA^{PHE} as a putative primer tRNA.

Nucleic Acids Res. 11, 7169-7179

ONO M., KITASATO H., OHISHI H., MOTOBAYASHI-NAKAJIMA Y. (1984):

Molecular cloning and long terminal repeat sequences of intracisternal A-particle genes in *Mus caroli*.

J. Virol. 50, 352-358

ONO M., TOH H., MIYATA T., AWAYA T. (1985):

Nucleotide sequence of the syrian hamster intracisternal A-particle gene: close evolutionary relationship of type A-particle gene to types B and D oncovirus genes.

J. Virol. 55, 387-394

PATERSON B.M., SEGAL S., LUEDERS K.K. KUFF E.L. (1978):

RNA associated with murine intracisternal type A-particles codes for the main particle protein.

J. Virol. 27, 118-126

PIKO L., HAMMONS M.D., TAYLOR K.D. (1984):

Amounts, synthesis, and some properties of intracisternal A particle-related RNA in early mouse embryos.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 488-492

RECHAVI G., GIVOL D., CANAANI E. (1982):

Activation of a cellular oncogene by DNA rearrangement: possible involvement of an IS-like element.

Nature 300, 607-611

SHEN-ONG G.L.C., COLE M.D. (1982):

Differing populations of intracisternal A-particle genes in myeloma tumors and mouse subspecies.

J. Virol. 42, 411-421

SHEN-ONG G.L.C., COLE M.D. (1984):

Amplification of a specific set of intracisternal A-particle genes in a mouse plasmacytoma.

J. Virol. 49, 171-177

SOUTHERN E. (1975):

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. 98, 503-517

TEMIN H.M. (1981):

Structure, variation and synthesis of retrovirus long terminal repeat.
Cell 27, 1-3

VARMUS H.E. (1982):

Form and function of retroviral proviruses.
Science 216, 812-820

WILSON S.H., KUFF E.L. (1972):

A novel DNA polymerase activity found in association with intracisternal A-type particles.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1531-1536

WIVEL N.A., SMITH G.H. (1971):

Distribution of intracisternal A-particles in a variety of normal and neoplastic mouse tissues.
Int. J. Cancer 7, 167-175

WIVEL N.A., LUEDERS K.K., KUFF E.L. (1973):

Structural organization of murine intracisternal A-particles.
J. Virol. 11, 329-334

WONG-STAAAL F., REITZ M.S. JR., TRAINOR C.D., GALLO R.C. (1975):

Murine intracisternal type A-particles: a biochemical characterization.
J. Virol. 16, 887-896

WUJCIK K.M., MORGAN R.A., HUANG R.C.C. (1984):

Transcription of intracisternal A-particle genes in mouse myeloma and Ltk-cells
J. Virol. 52, 29-36

YANG S.S., WIVEL N.A. (1973):

Analysis of high-molecular-weight ribonucleic acid associated with intracisternal A-particles.
J. Virol. 11, 287-298

YASUZUMI G., SUGIHARA R. (1958):

A comparative electron microscope study on Ehrlich ascites tumor cells,
Yoshida sarcoma cells, and human cancerous peritonitis ascites cells.
Cancer Res. 18, 1167-1170

YMER S., TUCKER W.Q.J., SANDERSON C.J., HAPEL A.J., CAMPBELL H.D.,
YOUNG I.G. (1985):

Constitutive synthesis of interleukin-3 by leukaemia cell line WEHI-3B is due
to retroviral insertion near the gene.
Nature 317, 255-258

YMER S., TUCKER W.Q.J., CAMPBELL H.D., YOUNG I.G. (1986):

Nucleotide sequence of the intracisternal A-particle genome inserted 5'to the
interleukin-3 gene of the leukaemia cell line WEHI-3B.
Nucleic Acids Res. 14, 5901-5918

YOTSUYANAGI Y., SZOLLOSI D. (1981):

Early mouse embryo intracisternal particle: fourth type of retrovirus-like
particle associated with the mouse.
J. Natl. Cancer Inst. 3, 677-685

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. mult. A. Mayr danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und seine stets aufgeschlossene Haltung.

Herrn PD Dr. V. Erfle möchte ich für die immer freundlich gewährte Hilfe und wertvolle Anregungen danken.

Außerdem danke ich Herrn Dr. P.G. Strauß für anregende Diskussionen.

Darüberhinaus bedanke ich mich sehr herzlich bei allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit geholfen haben, insbesondere bei Herrn Robert Baier für die Beratung bei allen methodischen Problemen und bei Frau Ellen Closs für die Anzucht der F9 Zellen.

Für die Durchführung der Fotoarbeiten danke ich herzlich den Mitarbeitern des zentralen Fotolabors der GSF.

Nicht zuletzt danke ich Olaf, ohne den diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Lebenslauf

Elisabeth Seidel

24.10.1961	geboren in Neuburg/Donau Vater: Helmut Seidel Mutter: Hildegard Seidel, geb. Speth
1967-1971	Besuch der Volksschule in Neuburg
1971-1980	Besuch des Descartes-Gymnasiums in Neuburg
27.06.1980	Abitur
1981-1986	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians Universität München
30.07.1986	Staatsexamen
17.09.1986	Approbation
November 1986	Beginn der Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation
01.08.1987	Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung für Molekulare Zellpathologie der GSF Neuherberg.

